VOLUMEN 11 OCTUBRE-DICIEMBRE 1958 NUMERO 4

Microbiología Española

Publicada por
el Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología
y la Sociedad de Microbiólogos Españoles

MYCOLOGICAL INSTITUTE
28 MAR 1960

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MADRID

CONSEJO DE REDACCION

Prof. Dr. Gerardo Clavero del Campo, Presidente de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Prof. Dr. Lorenzo Vilas López, Director del Instituto «Jaime Ferrán», de Microbiología, del C. S. I. C., y Secretario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Dr. Ricardo Salaya León, Bibliotecario de la Sociedad de Microbiólogos Españoles.

Secretario: Dr. Luis Sánchez Palomino.

SUMARIO

Páginas

Obtención y estudio de un crecimiento de tipo "L" en *Pseudomonas aeruginosa,* por *Rodrigo Moreno San Martín* y *Miguel Rubio Huertos* 327

Variación R-S en *Candida guilliermondii* (Cast) Langeron y Guerra, por *Juan Santa María*.. 343

Determinación de anticuerpos fijadores del complemento en sueros de conejos inmunizados con virus antivariólico (Continuación), por *María del Rosario de Zuazo Aguirre* 351

Relación entre la concentración de triptofano en los tallos de olivo y la localización de los tumores bacterianos, por *R. Beltrá*... ... 401

Comportamiento frente a los antibióticos, de asociaciones bacterianas procedentes de infecciones del aparato urinario, por *Antonio Portolés* 411

El Congreso de Estocolmo 429

Actas de la Sociedad.. 433

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

OBTENCION Y ESTUDIO DE UN CRECIMIENTO DE TIPO «L» EN *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

POR

RODRIGO MORENO SAN MARTIN y MIGUEL RUBIO HUERTOS

La obtención de formas "L" no ha sido señalada en *Ps. aeruginosa,* ni hemos encontrado en la bibliografía que haya sido intentada su investigación, sin duda por no ser sensible este organismo a la penicilina, sustancia que se emplea generalmente como medio de inducción para producir estas formas. No obstante, ya Socias Amorós (14) describe en 1946 la producción de una colonia gelatinosa y que es portadora de diversas formas pleomórficas, además de estar sometida a una lisis de tipo metabólico.

Continuando los trabajos que comenzamos en *Proteus vulgaris* (11) hemos obtenido con *Ps. aeruginosa* un crecimiento en velo, constituído por diversos tipos de formas "L" y cuyos detalles exponemos en este trabajo. Como sustancia inductora de este crecimiento ha sido empleada glicocola.

El género *Pseudomonas* está formado por bacilos móviles productores de pigmento soluble en agua. La especie tipo es el *Ps. aeruginosa,* bacilo móvil, generalmente con un flagelo. Gram-negativo.

Muchos de los caracteres diferenciales que se señalan para este género no son absolutamente específicos; por otra parte el *Ps. aeruginosa,* que produce varios pigmentos, piocianina, verdeflourescente, etc., tiene también algunas variedades acromógenas, y además esta produción de pigmentos es dependiente del medio de cultivo y de las variaciones de este organismo, que posee un elevado grado de disociación, por todo lo cual ha sido muy discutida la identificación de este germen.

PRODUCCION DE PIGMENTOS Y PLEOMORFISMO EN *PS. AERUGINOSA*

Basándose en la producción de pigmentos, Jordán, en 1898 (9), divide el *Ps. aeruginosa* en cuatro variedades: 1) Productores de piocianina y fluoresceína. 2) De piocianina solamente. 3) De fluoresceína solamente. 4) No cromogénica.

Meader, Robinson y Leonard (10) dicen que todas las razas de *Ps. aeruginosa* producen tres fermentos solubles en agua: 1) Pigmento fluorescente, 2) Piocianina; y 3) Piorrubina.

Estos pigmentos presentan ciertas propiedades: la piorrubina no es afectada con cambio de color por el tratamiento con ácido o álcali, en cambio los otros son indicadores. La piocianina tratada con ácidos produce sales rojas; reducida a la leucobase, es incolora y se oxida con el aire.

El pigmento azul-verde, piocianina, tiene carácter antibacteriano y es soluble en cloroformo. Schoental (12) aisla de los extractos clorofórmicos de *Ps. aeruginosa* piocianina, oxifenacina y un aceite amarillo pálido, todos con propiedades antibacterianas.

Hadley (5) observa que muchos cultivos pierden su habilidad para producir el pigmento azul-verde soluble en cloroformo, y algunas colonias producían un pigmento amarillo fluorescente, variación que está en relación con la morfología de la colonia.

Gaby (4), siguiendo los trabajos de Hays y colab. (7) que estudian los métodos de producción de sustancias antibacteriales, ha estudiado los cambios en la morfología de las colonias resultantes de la variabilidad de este organismo. Por diferentes pases, a partir de un cultivo bacteriano con colonias de diversos aspectos, llega a tres tipos de colonias que describe como A, B y R.

Las colonias del tipo A aparecen como circulares, suaves, productoras de los pigmentos amarillos fluorescentes. Las colonias de tipo B eran pequeñas, translúcidas y delicadamente granulares y productoras del pigmento azul-verde piocianina. Las colonias R eran más variables, rizadas y planas, finamente o groseramente granulares y, con el tiempo, filamentosas, y aún son descritas otras variaciones.

Como puede verse por todo lo anterior, el organismo que estudiamos

presenta una gran variabilidad en el aspecto de las colonias, que además está relacionado con la producción de pigmentos.

Otro factor de importancia en las características del *Ps. aeruginosa* es la producción de mucilago en determinados medios con diversas fuentes de carbono. Conectada con esta producción está la colonia gelatinosa descrita por primera vez en 1946 por Socias (14), y llamada G, la cual es obtenida a partir de unas colonias secundarias producidas por la colonia normal, que producen una colonia gelatinosa, la colonia G, que es cultivada en patata glicerina-agar, medio preparado de una manera especial, que es descrita.

Posteriormente, es descrita una colonia semejante por Schultz (13) y por Danz y Schultz (2).

Finalmente, Socias Amorós (15) revisa el trabajo anterior y aporta algunas nuevas consideraciones sobre este tema. En cuanto a la morfología de los organismos que se encuentran en esta colonia mucosa son descritos largos filamentos, cuerpos globoides y cocobacilos con cápsulas, estando todas estas formas como embebidas en un magma. Son vistas también granulaciones sueltas en los límites de resolución del microscopio.

Ultimamente, en 1956, Williamson (17) describe también la formación de una colonia mucoide, la cual es obtenida a partir de colonias suaves "smooth" aisladas del cultivo original. Estas colonias en medio Haynes (6) producen una colonia de tipo mucoide, con tal producción de este material, que da formaciones con aspecto de estalactita, que alcanzan la tapa inferior de la caja de cultivo. A partir de estas colonias, por selección periférica, se pueden obtener variantes filamentosas.

Morfológicamente, las células de las variantes mucoides no presentan variación; las células de la variante filamentosa, por el contrario, son pleomórficas; varían en longitud de 4 a 300 micras, estando constituído cada filamento por una sola célula, que carece de flagelo.

Como vemos, han sido descritas en la literatura distintas formas de crecimiento en *Ps. aeruginosa*. Estas variaciones son debidas en parte a cambios espontáneos del bacilo, y en parte, a las condiciones de cultivo. En estos cambios están relacionados íntimamente la morfología y los diversos tipos de pigmentos.

MATERIAL Y METODOS

El organismo usado ha sido razas de laboratorio de *Ps. aeruginosa* procedente de la Facultad de Farmacia de Madrid y otra, cepa-R, proporcionada por el Dr. Sierra.

Los medios usados han sido probados con vistas a obtener un mayor rendimiento de piocianina, por haber sido comprobado que estos medios son más favorables para la producción del crecimiento "L".

La producción de piocianina ha sido estudiada por diferentes autores y parece generalmente admitido que los iones sulfato, fosfato y magnesio son esenciales para la producción de piocianina. También es recomendada una fuente de nitrógeno, como asparraguina, peptona o sales inorgánicas, como NO_3NH_4, etc.

Young (18) encuentra que no se producía pigmento en un medio conteniendo más de 1 % de glucosa, atribuyéndolo a la adquisición de un pH bajo. El mantenimiento de un pH por arriba de 7,6 es de interés para la producción de piocianina y es recomendada la adición de greda por Hellinger (8).

La peptona es un medio bueno para la producción de piocianina, pues el organismo libera el nitrógeno que necesita a partir de ella. Un medio conteniendo 1 % de peptona puede ser usado para mantener el organismo y preservar la habilidad para dar buenas cantidades de pigmento.

Para la producción de piocianina puede ser usado el medio de Turffit n.º 2 de la siguiente composición :

$SO_4\ 7H_2O$	0,025 %
PO_4HK_2	0,1 %
NO_3NH_4	0,1 %
Etanol...	0,1 %

En este medio, además de las sales, es suministrada una fuente energética; en cambio no es necesario que la aportación de nitrógeno sea por una sustancia orgánica. El $ClNH_4$ puede sustituir con ventaja al NO_3NH_4.

Pero el medio de elección que hemos encontrado para la producción de piocianina es el de Burton Eagle y Campbell (1), del que existen dos variantes: una que emplea glicina y otra, d-l alaina.

La fórmula es la siguiente:

SO_4Mg	0,2 %
PO_4HK_2 $7H_2O$	0,04 %
SO_4Fe $7H_2O$	0,001 %
Glicerina	1 %
Glicina o d-l alanina	0,4 %
L-Leucina	0,8 %

En este medio, como se ve, la peptona es sustituída por aminoácidos y constituye un medio químicamente definido. Este medio es empleado por nosotros solidificado con agar a 1,2 %.

Rendimientos similares y aún mejores se obtienen sustituyendo la l-leucina y la d-l alanina o glicina, por casaminoácidos libres de vitaminas Difco, que hemos empleado nosotros, modificando así el medio de Burton. En este caso empleamos una concentración de casaminoácidos de 0,5 %.

En estos medios, sin embargo, si el pH es bajo se obtiene pigmentación débil y rojiza, producida por las sales ácidas de piocianina. El pH debe ser tenido, como hemos dicho, alrededor de 8.

Para la obtención de verde fluorescente hemos usado el medio de Turffit n.º 1, que carece de fuente de carbono; la composición es la siguiente:

Asparraguina	0,3 %
$SO_4Mg.$ $7H_2O$	0,05 %
PO_4HK_2	0,05 %

En caldo glucosado encontramos la producción de una pequeña coloración amarilla. Las siembras son realizadas siempre a partir de cultivos en peptona.

Inducción del ciclo L por medio de glicina.

Operamos empleando como medio de cultivo únicamente el medio de Burton y también con la variación de casaminoácidos propuesta por nosotros.

Los cultivos son realizados en tubos inclinados, con el medio sólido

y pH 7,6. Después de sembrado y mantenido en la estufa a 37° durante una hora, es añadida una solución de glicina, que es preparada al 5 % y al 10 % según las diferentes razas empleadas. Después de cultivada venticuatro horas en la estufa, es guardada en la nevera a 4° C. durante varios días.

La producción de velo se realiza en un tiempo variable y con diferente intensidad en los distintos tubos encima de la solución de glicina. Generalmente aparece a las cuarenta y ocho horas de permanencia en la nevera. El velo, al principio, es membranoso y se va haciendo mucoso y más fácil de ser arrastrado por el asa. Hacemos tomas periódicas del velo cada veinticuatro horas, durante un mes, empleando diferentes tubos.

Las formas bacilares existentes sufren diversas transformaciones, que se realizan con relativa lentitud, lo que permite mejor su estudio.

DESCRIPCION DE LAS FORMAS ENCONTRADAS

Las observaciones de las formas "L" producidas fueron hechas con un microscopio Zeiss de contraste de fases, siendo estudiadas por este medio y también empleando las tinciones con fuchsina fenicada, tinción Gram y Giemsa. La fijación en las tinciones fué hecha generalmente con metanol-formaldehido.

También han sido examinadas al microscopio electrónico, siendo empleado un RCA de 50 KV., del Instituto de Optica "Daza de Valdés", del C. S. I. C. (*). Estas preparaciones fueron fijadas con ácido ósmico al 1 % y luego sombreadas con paladio.

Por la observación de estas preparaciones fué encontrado primeramente un acusado pleomorfismo en los bacilos, en formas abultadas en un extremo o en el centro. Más tarde el abultamiento central va absorbiendo toda la masa del bacilo hasta llegar a encontrarse solamente formas redondas de diversos tamaños, de las consideradas como formas intermedias y grandes cuerpos. Algunas de éstas crecen en tamaño, formando un grupo frecuentemente vacuolado. Estas formas son igualmen-

(*) Nos complace dar las gracias al Dr. Fernando Catalina, Jefe de la Sección de Electrónica del Inst. "Daza Valdés" de Optica, por su ayuda en la obtención de las fotografías electrónicas.

te observables al microscopio de contraste de fases, viéndose grandes cuerpos típicos aislados. Estas formas son más parecidas a los organismos "pleuropneumonía-like" y protoplastos bacteriales que a otras formas "L" obtenidas por nosotros en otros organismos.

En las preparaciones al microscopio electrónico observamos grandes cuerpos redondos, pero de contorno algo irregular. Frecuentemente se hallan aglomerados, formando una gran masa, vacuolada y unida por algunos filamentos. No observamos formas enanas. Estas observaciones fueron hechas a partir de tomas realizadas en el velo, según hemos descrito.

También pueden observarse, cuando son cultivados estos organismos en medio líquido y sometidos a la acción de la glicina en concentración final del medio de cultivo a 5 %, la producción de largos filamentos, los cuales están formados por zonas alternativamente opacas y translúcidas. Constituyen también unas extrañas formaciones, que han sido observadas como una especie de red o masa vacuolada (fotos 4 y 5), de constitución regular, las cuales pudimos observar, tanto en el microscopio óptico como en el electrónico, para comprobar que no se trataba de artefactos, pero cuyo significado no hemos podido definir de una manera cierta.

DISCUSION

El tipo de crecimiento que hemos descrito consideramos que es un crecimiento tipo "L", aunque no podemos señalar la existencia de un ciclo completo. Los organismos descritos son tomados del velo en crecimiento sobre la glicina señalada. Realizando siembras sobre agar común del velo, se observa la reversión de las formas que describimos a la bacilar.

El crecimiento mucilaginoso que se observa en la parte sólida del tubo contiene también formas pleomórficas, probablemente semejantes a las formas "L", pero son de difícil observación por estar embebidas en una gran masa mucilaginosa.

El tipo, pues, de crecimiento que describimos en este trabajo es análogo al encontrado por Dienes (3) para *Proteus,* en cultivos en medio líquido y creciendo en velo. Los grandes cuerpos y formas intermedias

encontradas presentan los caracteres generales de estas formas, encontrándose grandes cuerpos con membrana y otros semejantes a protoplastos.

RESUMEN

Describimos un crecimiento en velo de *Ps. aeruginosa* sobre glicina al 10 %, después de haber sido sembrado este organismo en medio Burton, solidificado y conservado después a baja temperatura. Este crecimiento incluye la producción de formas redondas intermedias y grandes cuerpos; el examen de estas formas nos hace llegar a la conclusión de que constituyen partes de un ciclo "L" y que son distintas a las formas pleomórficas que se presentan en *Ps. aeruginosa* y que han sido descritas anteriormente por otros autores.

El crecimiento "L" no ha sido descrito anteriormente en *Pseudomonas aeruginosa*. Este organismo no es afectado por la penicilina, por lo cual hemos empleado glicina a 5 % y 10 %, y hemos podido comprobar que ésta tiene amplio margen de toxicidad frente al organismo que experimentamos.

Para la producción de pigmentos hemos estudiado diversos métodos de cultivo buscando una mayor producción de piocianina y hemos modificado el medio llamado de Burton en orden a sustituir la d-l alanina y l-leucina por casaminoácidos libres de vitaminas.

SUMMARY

"L" growth was induced by the combined action of 10 % glycine and low temperature on *Ps. aeruginosa* on Burton's medium.

A thin layer of "L" colonies were produced on the surface of the glycine solution added to the Burton's solid medium tubes.

The morphology of the different "L" forms was studied by light and electron microscopy and their different forms described.

BIBLIOGRAFIA

(1) Burton, M. O. y Eagles, B. A. Campbell, J. J. R. 1947. The aminoacid requirements for pyocianine production. Canad. J. Res. C. 25, 121.

(2) D. Danz, F. J. y Schultz, E. W. 1949. Gelatinous variants of *Pseudomonas aeruginosa*. J. of Bact. 58. 367.

(3) Dienes, L. 1953. Electron micrographs made from L forms of *Proteus* and two human strains of pleuropneumonia-like organisms. J. of Bact. 66, 280.

(4) Gaby, W. L. 1946. A study of the dissociative behaviour of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact. 51, 217-234.

(5) Hadley, P. 1927. Transmissible lysis of *Bacillus pyocyaneus*. J. Infectious. Diseases, 34, 260-304.

(6) Haynes, W. C. 1951. *Pseudomonas aeruginosa* its characterization and identification. J. gen. Microbiol. 5, 939-950.

(7) Hays, E. E.; Wells, I. C.; Katzman, P. A.; Cain, C. K.; Jacobs, F. A.; Thayer, S. A.; Doisy, E. A.; Gaby, S. L.; Oberts, E. C.; Muir, R. D.; Carroll, D. J.; Jones, L. R., and Wade, N. J. 1945. Antibiotic substances produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. Biol. Chem. 159, 725-750

(8) Hellinger, E. 1951. Requirements for pyocyanine production by *Pseudomonas aeruginosa* (Schroetor) *Migula*. J. Gen. Microbiol. 5, 633-639.

(9) Jordan, E. O. 1899. *Bacillus pyocyaneus* and its pigments. J. Explt. Med. 4, 627-647.

(10) Meader, P. D., Robinson, G. H. and Leonard, V. 1925. Pyrrubin, a red water soluble pigment characteristic of *Bacillus pyocyaneus*. Am. J. Hyg. 5, 682-708.

(11) Rubio Huertos, M. y Moreno San Martín, R. 1953. Obtención y estudio de las formas de *Proteus vulgaris*. Microbiol. Esp. 6, 195.

(12) Schoental, R. 1941. The nature of the antibacterial agents presents in *Pseudomonas pyocyaneus* cultures J. Exptl. Path. 22, 137-147.

(13) Schults, E. 1947. A gelations variant of *Pseudomonas aeruginosa*. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 65, 289-291.

(14) Socias Amorós, A. 1946. Un ciclo vital en *Ps. aeruginosa*. Anales del Inst. Esp. de Edaf. y Ecol. y Fis. Veg. V. Vol. II.

(15) Socias Amorós, A. 1949. Sobre la colonia gelatinosa del *Pseudomonas aeruginosa*, Microbiol. Espal. 2, 92-106.

(16) Warren, G. H. y Gray, J. 1955. Studies on the properties of a polysacharide constituent produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J. of Bact. 70, 153.

(17) Williamson, C. K.1 1956. Morphological and physiological considerations of colonial variants of *Pseudomonas aeruginosa*. J. of Bact. 71, 617.

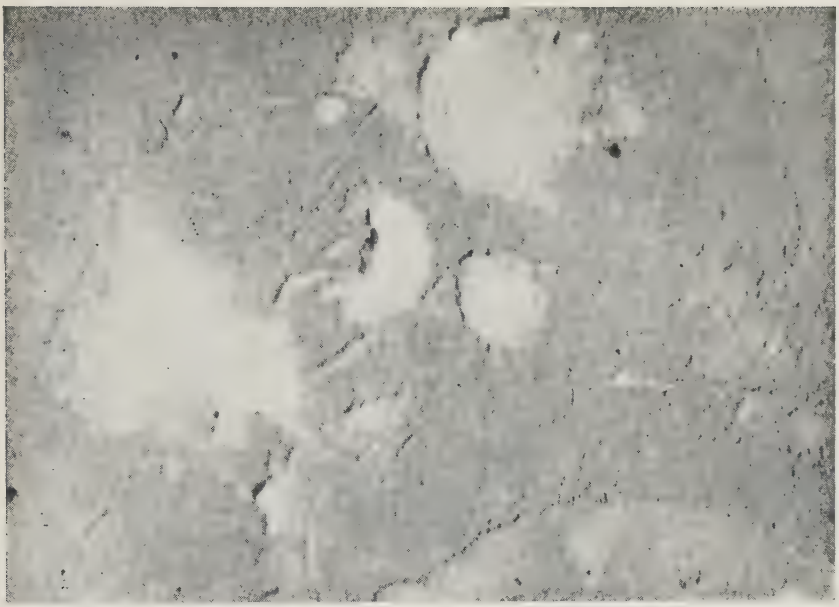
(18) Young, C. 1947. Pigment production and antibiotic activity in cultures of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bact. 54, 109.

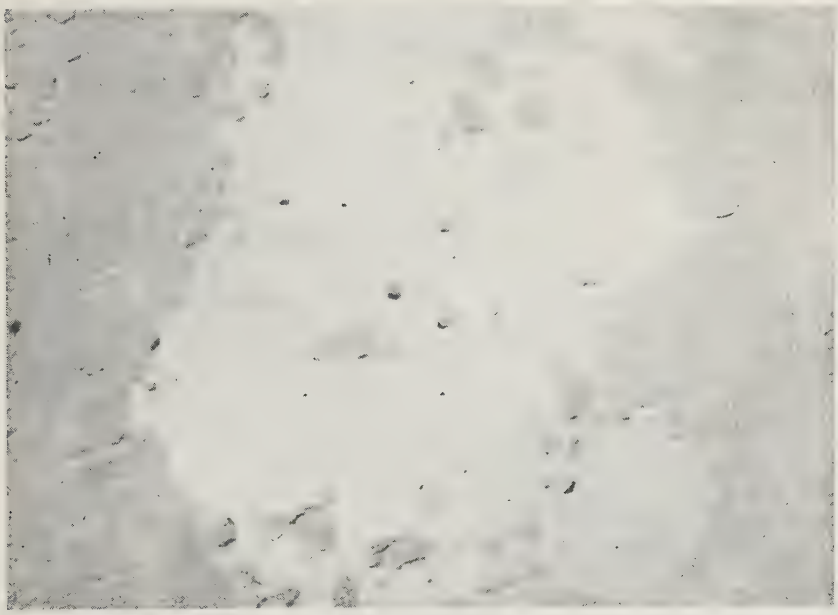
Foto 1.

Pseudomonas aeruginosa.—Microscopio electrónico. Sombreado con paladio. Bacteria normal x 15.500.

Fotos 2 y 3.

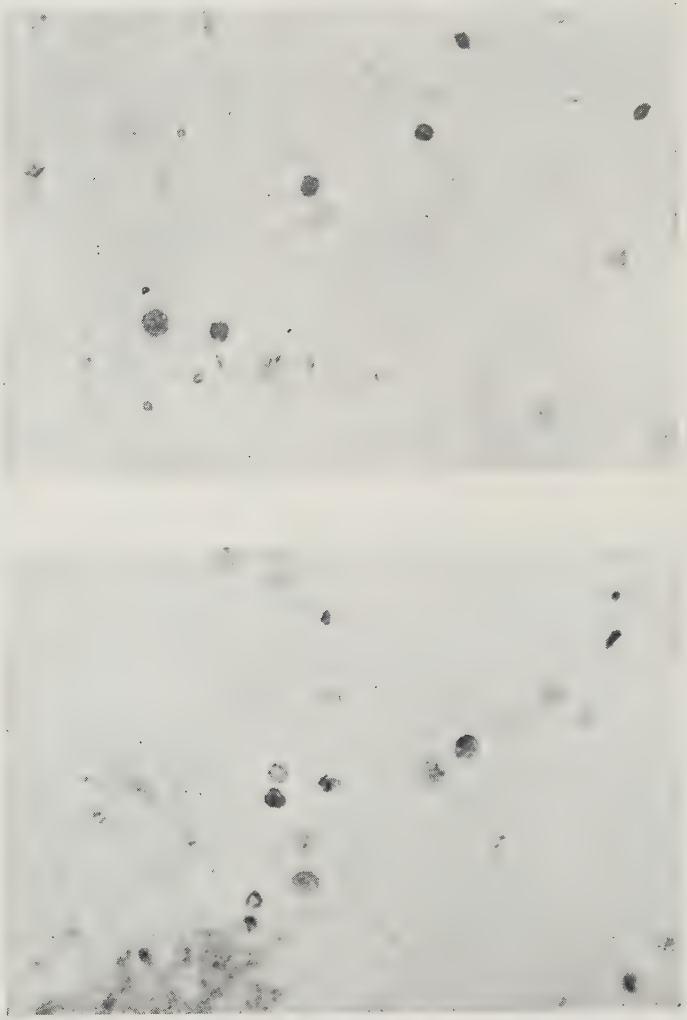
Formas L *Pseudomonas aeruginosa* x 15.500.—Microscopio electrónico. Sombreadas con paladio. Fijadas con ácido ósmico. En las fotografías se pueden observa· grandes formas aisladas, perfectamente delimitadas, aunque irregulares. Tambié formas pequeñas y masas protoplasmáticas, formadas por la reunión de aquéllas.. La membrana no se muestra patente. Algunos filamentos, aislados.





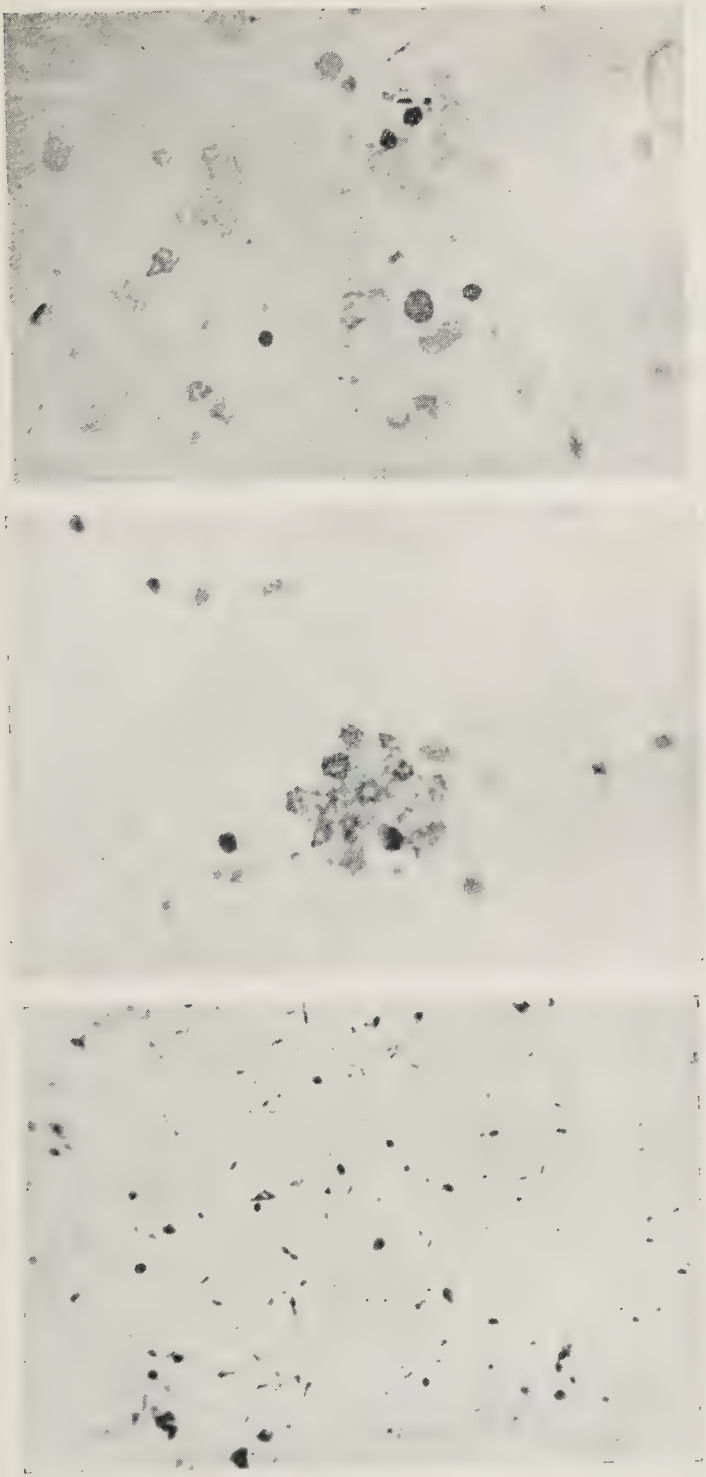
Fotos 4 y 5.

Formas L *Pseudomonas aeruginosa* x 15.500.—Microscopio electrónico. Sombreadas con paladio. Fijadas con ácido ósmico. La última fotografía presenta una masa citoplasmática vacuolada unida por ramales. Parece recordar las descripciones de Löhnis y Smith y de Fontes.



Foros 6 y 7.

Producción de formas L. Formas bacilares y formas L. Microscopio óptico. Tinción fuchsina fenicada.



Fotos 8, 9 y 10.

Formas L. Microscopio óptico. Grandes formas, algunas vacuoladas. Formas aisladas y en colonias. Tinción fuchsina fenicada.

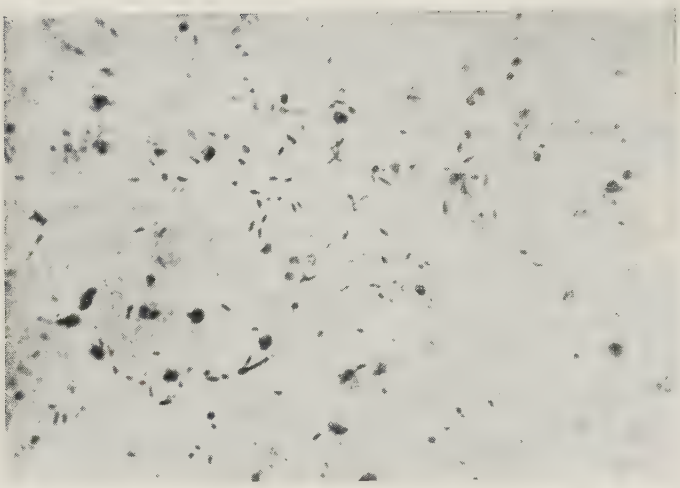


Foto 11.

Pseudomonas aeruginosa. Formas L. Microscopio óptico. Formas bacilares y formas intermedias. Tinción simple.

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS
SECCION DE BIOQUIMICA

VARIACION R-S EN *CANDIDA GUILLIERMONDII* (CAST) LANGERON Y GUERRA

POR

JUAN SANTA MARIA

Dentro de las mutaciones espontáneas que sufren las levaduras, una que se presenta con bastante frecuencia es la tendencia de los cultivos que forman colonias lisas, forma S, a producir colonias rugosas, forma R; esta variación va acompañada de modificaciones morfológicas en las células. Es frecuente que estos cambios aparezcan como sectores en las colonias (1) (2). Nosotros hemos encontrado una variación que apareció como sector en una colonia de *C. pulcherrima,* var. *liquefaciens* (3), y que sólo iba acompañada de la variación morfológica de las células y de la capacidad de formar pseudomicelio.

En las especies *Candida guilliermondii* y *Candida melibiosi,* establecen Lodder y Kreger-van Rij (2) las nuevas variedades *membranaefaciens,* que se distinguen de la especie por la formación de velo y el aspecto rugoso de las estrías; en ambos casos dichas autoras hacen constar que dichas variedades pueden ser simplemente una variación R del tipo original.

Hemos podido demostrar que esto es lo que realmente ocurre en *C. guilliermondii.*

METODOS

Agar de patata con propionato.—Se preparaba agar de patata glucosado Difco con 0,35 % de propionato sódico. En el momento de preparar las placas, se añadía por cada caja de Petri 0,2 ml. de solución estéril de ácido tártrico al 10 %.

Clasificación.—Los medios y métodos empleados en la clasificación eran los de Lodder y Kreger-van Rij (2) y Wickerham (4).

RESULTADOS

De un queso blando de Burgos se ha aislado una levadura de las siguientes características:

Levadura anascosporógena, que se reproduce por gemación, formando pseudomicelio y blastosporas, no artrosporas. No tiene pigmentos carotenoides; disimilación fermentativa. Pertenece al género *Candida*.

Morfología.—A los tres días en agar de extracto de malta-extracto de levadura forma una estría rugosa (foto 5). Las células de los bordes de esta estría son de formas diversas: redondeadas, de (3-5) a (4-13) μ y células alargadas pseudomiceliales, de (5,2-6) x (14-20) μ (foto 1).

Velo.—A los tres días a 15°, en tubo de agua de malta, forma velo cerrado, rugoso y ascendente.

Pseudomicelio.—A los dos días en agar de patata Difco, forma un pseudomicelio bien desarrollado; a los cuatro días, desarrollo tan excesivo que no se puede observar. El pseudomicelio aparece a veces desnudo, a veces con blastosporas en cadenas más o menos largas (foto 3).

Fermentación.—Fermenta con producción de ácido y gas: glucosa (en cuatro días), sacarosa (en cinco días), rafinosa (en siete días) y galactosa (en dieciocho días, tubo Durham ½ de gas; en veinticuatro días, lleno). No fermenta, pero produce ácido de la maltosa, y ni fermenta ni produce ácido de la lactosa y melibiosa.

Asimilación.—Asimila glucosa, galactosa, sacarosa y maltosa. No asimila lactosa.

Asimilación de nitrato potásico.—Utilizando el medio líquido de Wickerham, es negativa o muy débil positiva.

Hidrólisis de la arbutina.—Positiva.

Siguiendo la sistemática de Lodder y Kreger-van Rij se llega a *Candida guilliermondii*, var. *membranaefaciens*.

Con motivo de otros estudios en marcha, se sembró en una placa del agar de patata con propionato que se ha descrito. A las ocho semanas, a 25°, se había formado una colonia de 1,8 cm. de diámetro (foto 9), en la que se distinguían un círculo central de unos siete mm. de diámetro,

levantado, cremoso, irregular, como con picaduras, limitado por una estrecha faja rojiza. El resto de la colonia es prácticamente liso, con bordes muy poco ondulados; en este borde se distinguían dos sectores (S, foto 9) distintos, que eran más blancos.

Del centro cremoso y de uno de los dos sectores, se sembraron en estrías de agar de extracto de malta-extracto de levadura.

La siembra que procedía del centro, reproducía el cultivo original. La del sector dió lugar a un cultivo que también pertenece al género *Candida,* de las siguientes características:

Morfología.—A los tres días en agar de extracto de malta-extracto de levadura forma una estría lisa y cremosa (foto 6). Las células de los bordes de esta estría son de formas diversas: redondas, ovales y cilíndricas y alguna mazuda de (3-6) a (3-15) μ (foto 2).

Velo.—A los tres días a 25°, en tubo de agua de malta, forma un velo seco muy ligero e incompleto.

Pseudomicelio.—Prácticamente igual que el cultivo original (foto 4).

Fermentación.—Fermenta con producción de ácido y gas: glucosa (en cinco días), sacarosa (en cinco días), rafinosa (en siete días) y galactosa (en dieciocho días); maltosa muy débil (en cinco días ácido y una burbujita de gas; en veinticuatro días, 1/4 de tubo Durham lleno de gas). No produce ni ácido, ni gas de lactosa y melibiosa.

Asimilación.—Asimila glucosa, sacarosa, maltosa y galactosa. No asimila lactosa

Asimilación de nitrato potásico.—Negativa.

Hidrólisis de la arbutina.—Positiva.

Siguiendo la diagnosis de Ladder y Kreger-van Rij se llega a *Candida guilliermondii.*

Se hacen colonias de los dos cultivos en agar de extracto de malta-extracto de levadura. A los dieciocho días a 17°, el cultivo original forma una colonia circular de 1,2 cm. de diámetro rugosa (foto 7), y el procedente del sector, una colonia ovalada de 1,2 a 1,5 cm. lisa y cremosa (foto 8).

DISCUSION

Es evidente que, como suponían Lodder y Kreger-van Rij, en *Candida guilliermondii* y *C. guilliermondii,* var. *membranaefaciens,* nos encontramos en una típica variación R - S.

Si es indudable que en Taxonomía una especie debe incluir a todos los posibles mutantes, ya es más dudosa la conveniencia de establecer una variedad para un mutante.

La diferencia en la fermentación de la maltosa no es significativa, dado lo débil que es en la forma S; ya apuntan Lodder y Kreger-van Rij que la fermentación de la maltosa en *C. guilliermondii* es negativa o raramente muy débil positiva. Igual podemos decir de la asimilación del nitrato potásico.

RESUMEN

Ha sido posible, haciendo un aislamiento de un sector, que apareció en una colonia de *C. guilliermondii,* var. *membranaefaciens* (aislada de un queso blando), comprobar que la variedad *membranaefaciens* representa simplemente la forma R, y la especie *C. guilliermondii,* la forma S, siendo, por tanto, dudosa la conveniencia de establecer dicha variedad *membranaefaciens.*

En el desarrollo de este trabajo se ha contado con una Ayuda de la "Fundación March".

SUMMARY

Candida guilliermondii was isolated from a sector in a colonie of *C. guilliermondii,* var. *membranaefaciens* isolated from a soft cheese. Therefore, the variety *membranaefaciens* is nothing but the R-variation of the original type and it is questionable the separation of the variety.

BIBLIOGRAFIA

(1) Henrici, A. T. 1947. Molds, Yeasts and Actinomycetes. 2.ª ed. Wiley, New York.

(2) Lodder, J. Kreger-van Rij, N. J. W. 1952. The Yeasts. A. Taxonomic study. North-Holland Publishing Co. Amsterdam.

(3) Santa María, J. 1953. Empleo de los medios sintéticos de Wickerham en los estudios sobre nutrición de los microorganismos. Microbiología Española, 6, 39-61.

(4) Wickerham, L. J. 1951. Taxonomy of Yeasts. U. S. Dept. Agr. Technical, Bulletin, núm. 1.029.

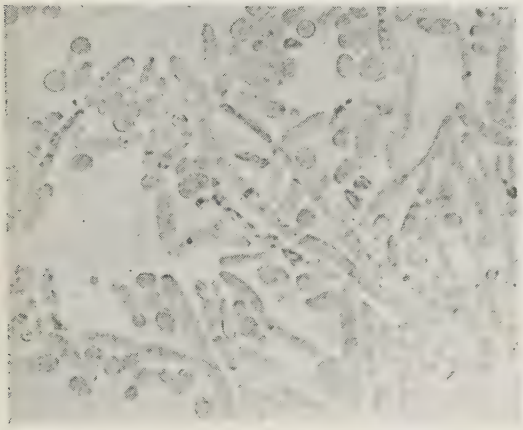


Foto 1.

C. guilliermondii, var. *membranaefaciens.* — Del borde de una estría de agar de extracto de levadura-extracto de malta a los tres días a 25°. Sin colorear. 710 x

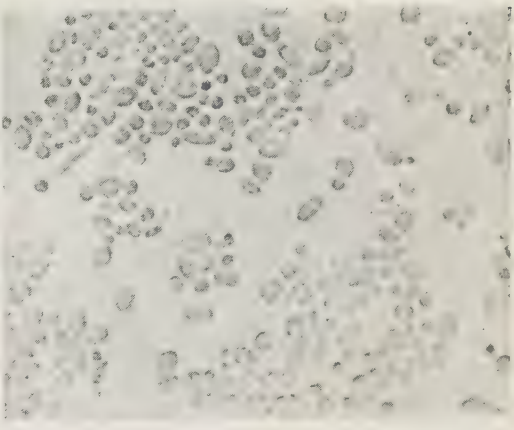


Foto 2.

C. guilliermondii.—Del borde de una estría de agar de extracto de levadura-extracto de malta, a los tres días a 25°. Sin colorear. 710 x

Foto 3.

C. guilliermondii, var. *membranaefaciens.*—Cultivo en porta-objetos, según la técnica de Rivalier-Seydel, sobre agar patata, a los dos días a 25°. 250 x

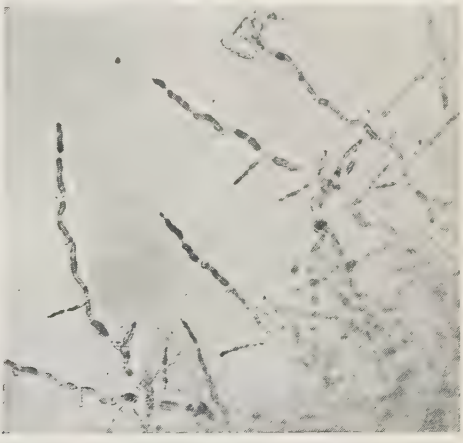


Foto 4.

C. guilliermondii.—Cultivo en porta-objetos, según la técnica de Rivalier-Seydel, sobre agar patata, a los dos días a 25°. 250 x

Foto 5.

C. *guilliermondii*, var. *membranaefaciens*.—Estría en agar de extracto de levadura-extracto de malta, a los tres días a 25°.

Foto 6.

C. guilliermondii.—Estría en agar de extracto de levadura-extracto de malta, a los tres días a 25°.

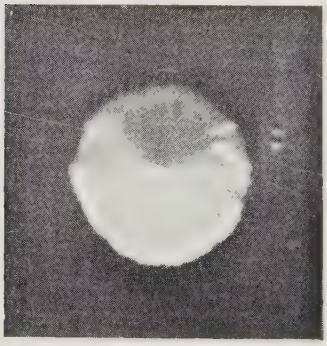


Foto. 7.

C. guilliermondii, var. *membranaefaciens*.—Colonia en agar de extracto de levadura-extracto de malta, a los dieciocho días a 17°. 2 x

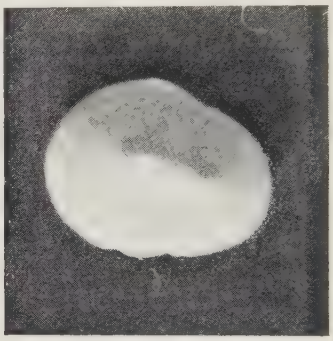


Foto 8.

C. guilliermondii. — Colonia en agar de extracto de levadura - extracto de malta, a los dieciocho días a 17°. 2 x

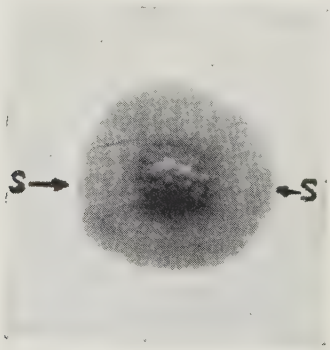


Foto 9.

Colonia de *C. guilliermondii*, var. *membranaefaciens* en agar de patata con propionato, a las ocho semanas a 25°. De uno de los sectores S, se aisló *C. guilliermondii*. 1,4 x

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA
SECCION DE VIRUS

DETERMINACION DE ANTICUERPOS FIJADORES DEL COMPLEMENTO EN SUEROS DE CONEJOS INMUNIZADOS CON VIRUS ANTIVARIOLICO

(Continuación.)

POR
María del Rosario de ZUAZO AGUIRRE

SUEROS INMUNES

En el caso particular de la vacuna, se ha demostrado que el suero de los conejos inmunizados reacciona *in vitro* con material que contenga virus procedente de las pústulas de la viruela o de la vacuna en el hombre, dando una fijación completa. Esta reacción es específica y confirma la semejanza antigénica o identidad en los virus de la vacuna y de la viruela. La linfovacuna contiene, al mismo tiempo que el virus de la vacuna, sustancias derivadas de las terneras y cierto número de bacterias no patógenas que la contaminan: sustancias parecidas se encuentran en el material que se obtiene de las lesiones cutáneas humanas y de los conejos escarificados.

Se ha supuesto que las reacciones indicadas anteriormente pueden ser debidas a antígenos bacterianos extraños que contaminan la inoculación, y no a los antígenos derivados del virus.

Bedson y Bland (37) demostraron que el suero antivacuna no fija el complemento en presencia de bacterias derivadas de la linfovacuna y que tampoco el antisuero preparado contra aquellas bacterias fija el complemento en presencia de la linfa.

Craigie y Tulloch (38) indican que el antisuero preparado contra las bacterias infectivas secundarias, halladas en las costras de virue-

la y de vacuna, no da floculación visible con los extractos de costras.

Advierten, además, que los antisueros preparados inyectando conejos con extractos de órganos bacteriológicamente estériles de animales que padecen vacuna generalizada experimental, dan floculaciones bien patentes con extractos de costras, y que los antisueros preparados contra la linfovacuna dérmica floculan de manera franca con extractos de órganos que contienen virus.

Obtención de nuestros sueros.

Siguiendo diferentes pautas de inoculación, hemos obtenido 50 sueros inmunes de conejos. Inactivados a 56° C. durante media hora, los primeros fueron liofilizados, lo que nos ha permitido titularlos con los distintos antígenos y comprobar su mayor o menor poder antigénico. Hemos tratado de determinar la influencia de los materiales utilizados en las inmunizaciones, relación entre el tamaño de las lesiones y el título alcanzado por los sueros, posibilidad de obtener sueros de alto título sin lesiones aparentes en las punturas intradérmicas, y, por último, cuando aparecen en el suero de los conejos inoculados los anticuerpos fijadores de complemento y el tiempo que persisten en el mismo.

Titulación de nuestros sueros.

Como es sabido, cuanto más se incuben las mezclas de antígeno, suero y complemento, más complemento es fijado por una cantidad determinada de anticuerpo. El factor que controla la temperatura y la duración de incubación es la deteriorización espontánea del complemento, siendo ésta más lenta a temperaturas bajas (5° C.) y más rápida a temperaturas sobre 30° C. También es sabido que la reacción es más sensible en la helera que en la incubadora. Por otro lado, la acción anticomplementaria del suero y antígeno es más pronunciada en pruebas usando la helera durante mucho tiempo que usando el baño maría a 37° C. una hora Esta dificultad puede eliminarse usando antígenos que no tengan propiedades anticomplementarias.

El procedimiento usado es como sigue:

Los volúmenes para las titulaciones y las pruebas se completan hasta un c. c. con solución salina. El amboceptor es obtenido de un conejo

blanco (de 2.700 gramos de peso), previamente inyectado con eritrocitos de carnero lavados y diluídos al 1/2 con solución salina. Las inyecciones se hacen a diario con células frescas (intravenosamente) y durante diez días. Después de diez días de la última inyección, se sangra el animal por la oreja para una prueba preliminar. Si el suero tiene suficiente potencia, se sangra el conejo a muerte. El suero se conserva añadiendo un volumen igual de glicerina estéril químicamente pura o borato fenil mercurio en cantidad para que quede al 1/10.000.

Titulación del amboceptor hemolítico anticarnero (hemolisina).

En una serie de diez tubos se colocan las siguientes diluciones de hemolisina: 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1.000 y 1/2.000, 0,20 c. c. en cada tubo. A cada tubo se añaden 0,20 c. c. de hematíes, diluídos al 2/100, y 0,20 c. c. de complemento, diluído al 1/30. Se completa el volumen hasta un c. c. con solución salina, o sea 0,40 c. c. por cada tubo.

Al mismo tiempo preparamos tres tubos controles: el primero con 0,20 c. c. de la dilución de hemolisina al 1/10, 0,20 c. c. de la suspensión de hematíes y sin complemento, por lo que se añade 0,60 c. c. de solución salina, para completar el volumen hasta un c. c.; en el segundo ponemos 0,20 c. c. de la dilución del complemento, 0,20 c. c. de hematíes y 0,60 c. c. de solución salina suprimiendo la hemolisina, y en el tercero se suprime la hemolisina y el complemento, por lo que ponemos 0,20 c. c. de hematíes y 0,80 c. c. de solución salina.

Incubados en baño maría a 37° C., durante media hora, la unidad hemolítica estará contenida en 0,20 c. c. de la dilución más alta de suero de conejo (anticarnero) capaz de producir hemolisis de 0,20 c. c. de eritrocitos suspendidos al 2/100 en presencia de 0,20 c. c. de complemento al 1/30, incubado a 37° C., treinta minutos.

Suspensión de eritrocitos sensibilizados.

Se recoge asépticamente sangre de carnero en un volumen igual de solución de Alserver's. Esta contiene por cada 100 c. c.: 2,05 de dextrosa, 0,8 gramos de citrato sódico, 0,42 gramos de cloruro sódico y 0,055 gramos de ácido cítrico. El pH de esta solución es de 6 a 6,2.

La cantidad de sangre necesaria se lava tres veces con solución salina, centrifugándose cada vez a 2.000 r. p. m. durante diez minutos. Se toma nota del volumen de células en el sedimento y la dilución al 2/100 se hace añadiendo 49 partes de solución salina por cada parte de células rojas. La suspensión de células sensibilizadas se hace mezclando partes iguales de la suspensión de eritrocitos al 2/100 y una dilución de la hemolisina conteniendo dos unidades hemolíticas por cada 0,20 c. c.

Complemento.

Se obtiene sangrando diez o doce cobayas por el corazón. La sangre se recoge por separado, dejándola a temperatura ambiente una hora y en la heladora toda la noche. Los sueros se titulan individualmente a las veinticuatro horas de la sangría, y aquellos que tengan un título bajo se descartan. Un título bajo es aquel que no produce hemolisis (en volumen de 0,14 c. c.) de 0,40 c. c. de células sensibilizadas, en una hora, a 37° C. Los sueros potentes son mezclados y repartidos en tubos en la cantidad necesaria para las reacciones de fijación del complemento y conservados a —70° C. en cámara de hielo carbónico.

Titulación del complemento.—Todos los reactivos deben conservarse fríos durante la prueba.

Se hace una dilución del complemento al 1/30. Usando una pipeta calibrada en centésimas, se miden las siguientes cantidades de complemento al 1/30: 0,05, 0,08, 0,10, 0,12, 0,14, 0,16, 0,18 y 0,20 c. c. Se añade suficiente solución salina estéril a cada tubo para completar el volumen hasta 0,60. Las mezclas de complemento se incuban a 37° C. en baño maría una hora. Después se añade 0,40 c. c. de células sensibilizadas a cada tubo. Las células y la hemolisina son mezclados quince minutos antes de la reacción. El complemento debe ser titulado inmediatamente antes de su empleo.

Reacción de fijación del complemento.

En una serie de ocho tubos colocamos, partiendo de suero puro inactivado diluciones de éste al 1/2, 1/5, 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/100, 1/110, 1/120 y 1/130, en la cantidad de 0,20 c. c. por cada dilución; añadimos a cada tubo 0,20 c. c. del complemento diluído de modo que

contenga dos unidades, y 0,20 c. c. del antígeno diluído al título. Los tubos se agitan, después de añadir cada uno de los reactivos, y después son colocados en la helera para su incubación durante 16-18 horas. A la mañana siguiente se incuba de nuevo durante media hora en baño maría, a 37° C., después de haber añadido 0,40 c. c. del sistema hemolítico preparado quince minutos antes. Los resultados son anotados con los números 4, 3, 2, 1, 0 y el signo ±. El número 4 indica fijación total; el número 0, hemolisis total, y los demás números y el signo ± indican distintos grados de fijación.

El título del suero será aquel que dé 2 de fijación, por lo menos, a la dilución más alta.

Al mismo tiempo se preparan los siguientes controles:

Control suero.—Contiene 0,20 c. c. de cada una de las diluciones del suero, dos unidades de complemento, 0,20 c. c. de solución salina en sustitución del antígeno y 0,40 c. c. del sistema hemolítico.

Control del antígeno y del sistema hemolítico.—En una serie de cuatro tubos ponemos 0,05 c. c., 0,10, 0,15 y 0,20 c. c. de la dilución del complemento usado en la prueba; es decir, media, una, una y media y dos unidades. Se completa el volumen en cada tubo hasta 0,40 c. c. con solución salina, se añade a cada uno 0,20 c. c. del antígeno, no agregándoseles suero. Luego se les añade 0,40 c. c. del sistema hemolítico.

Los controles se someten a las mismas incubaciones que la prueba de fijación del complemento y ponen de manifiesto toda reacción anticomplementaria que haya ocurrido en la primera fase de incubación en nevera.

PAUTA SEGUIDA PARA LA TITULACIÓN DE NUESTROS SUEROS.

Titulación del suero número 13.

Con antígeno de embrión de pollo y alantoides de título 1/6.
0 = hemolisis total. ±, 1, 2 y 3 = grados intermedios de hemolisis.
4 = no hay hemolisis.

Tubos	Complemento	Diluciones previas del suero		Antígeno	Mezcla hemolítica	Resultados	Control
1	0,20 c. c.	Puro ..	0,20 c. c.	0,20 c. c.	0,40 c. c.	4	0
2	—	1/2 ..	—	—	—	4	0
3	—	1/5 ..	—	—	—	4	0
4	—	1/10 ..	—	—	—	4	0
5	—	1/20 ..	—	—	—	4	0
6	—	1/40 ..	—	—	—	4	0
7	—	1/80 ..	—	—	—	3	0
8	—	1/100..	—	—	—	1	0
9	—	1/110..	—	—	—	0	0
10	—	1/120..	—	—	—	0	0
11	—	1/130..	—	—	—	0	0

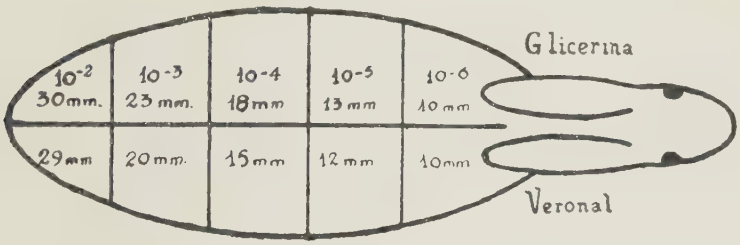
Título: 1/80.

Si es necesario se hacen diluciones intermedias entre 1/40, y 1/80, y 1/80 y 1/100.

Suero número 1.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente (método de Groth (39), con un triturado de *embrión de pollo* en glicerina y veronal a pH 9, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría a los *once días* de la inoculación.

ESQUEMA DE LAS LESIONES A LOS CINCO DÍAS.



TITULACIÓN DEL SUERO.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/90	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera al 1/7...	4	4	4	4	3	1	0	0	0
	Neurovacuna avirulento, puro	4	4	4	2	0	0	0	0	0
	Neurovacuna virulento, al 1/3...	4	4	4	4	3	1	0	0	0
	Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	4	3	2	0
Control suero.		±	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 1.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera ... ... Título 1/20
Con antígeno de neurovacuna avirulento (purificado).. ... — 1/10
Con antígeno de neurovacuna virulento (soluble)... ... ... — 1/20
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides... ... ... — 1/90

Suero número 2.

Procede de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *embrión de pollo* en glicerina y veronal a pH 8, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *once días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 8	30 mm.	23 mm.	18 mm.	13 mm.	10 mm.
Veronal pH 8.	29 —	20 —	15 —	12 —	10 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero..		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	4	3	2	1	0	0
	Neurovacuna avirulento, puro.	3	2	1	0	0	0	0	0
	Neurovacuna virulento, al 1/3.	4	4	4	4	3	2	1	0
	Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	3	2	1
Control suero...		1	±	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 2.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera. ... ... Título 1/20
Con antígeno de neurovacuna avirulento (purificado).. ... — 1/2
Con antígeno de neurovacuna avirulento (soluble).. ... ... — 1/40
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... — 1/80

Suero número 3.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *embrión de pollo* en veronal a pH 7, 8 y 9, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000. Virus activo. Sangría, a los *ochenta y cuatro días* de su inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Veronal pH 7.	15 mm.	12 mm.	8 mm.	6 mm.
Veronal pH 8.	14 —	12 —	10 —	5 —
Veronal pH 9.	15 —	10 —	10 —	5 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero..	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno: Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	4	3	2	1	1	0
Antígeno: Neurovacuna virulento, al 1/3.	4	4	4	3	2	±	0	0
Antígeno: Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	4	3	1
Control suero	2	1	1	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 3.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera ... ... Título 1/20
Con antígeno de neurovacuna virulento (soluble)... ... ... — 1/20
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... — 1/80

Suero número 4.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de embrión de pollo en veronal a pH 7 y 8, en las suspensiones 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000. Virus activo. Sangría, a los *setenta y siete días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Veronal pH 7.	25 mm.	20 mm.	10 mm.	6 mm.
Veronal pH 8.	20 —	18 —	10 —	3 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero..	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno: Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	3	3	2	2	±	0	0	0
Antígeno: Neurovacuna virulento, al 1/3.	3	3	2	1	1	0	0	0
Antígeno: Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	2	2	±
Control suero...	1	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 4.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera. ... ... Título 1/10
Con antígeno de neurovacuna virulento (soluble) ... ... — 1/5
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... — 1/80

Suero número 5.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *embrión de pollo* en glicerina a pH 5, 6 y 7, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000 y 1/10.000, después de *cincuenta días a la temperatura ambiente*. Sangría, a los *ciento nueve días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Glicerina pH 5	5 mm.	0 mm.	0 mm.
Glicerina pH 6	5 —	0 —	0 —
Glicerina pH 7	15 —	10 —	5 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno: Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	2	2	1	0	0	0	0	0
Antígeno: Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	3	2	0	0	0	0	0
Control suero...	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 5.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera ... ... Título 1/2
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... — 1/5

Suero número 6.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *embrión de pollo* en glicerina y veronal a pH 7, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000, después de *treinta y cinco días, a la temperatura ambiente.* Sangría, a los *treinta y ocho días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 7	23 mm.	20 mm.	14 mm.	10 mm.	7 mm.
Veronal pH 7.	19 —	15 —	12 —	10 —	5 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero..		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	4	3	2	2	1	±
	Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	3	3	2	2	1
Control suero...		4	3	3	2	1	1	±	±

Resultados obtenidos con el suero número 6.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera ... ... Título 1/40
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... — 1/80

Presenta gran poder anticomplementario.

Suero número 7.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *embrión de pollo* en glicerina y veronal a pH 9, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000, después de *treinta y cinco días a la temperatura ambiente.* Sangría, a los *treinta y ocho días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 9	20 mm.	18 mm.	16 mm.	12 mm.	10 mm.
Veronal pH 9.	18 —	15 —	15 —	12 —	10 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero..	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno: Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	4	4	3	2	1	0
Antígeno: Neurovacuna virulento, al 1/3.	3	3	2	2	1	0	0	0
Antígeno: Pústulas de piel de conejo, al ½	3	2	1	±	0	0	0	0
Antígeno: Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	3	1	0
Control suero...	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 7.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera ... ... Título 1/40
Con antígeno de pústulas de piel de conejo... ... ... — 1/2
Con antígeno de neurovacuna virulento (soluble). ... ... — 1/10
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides... ... ... — 1/40

Suero número 8.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de embrión de pollo en glicerina y veronal a pH 5, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *veintiún días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 5	25 mm.	21 mm.	18 mm.	15 mm.	9 mm.
Veronal pH 5.	20 —	18 —	15 —	10 —	6 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero..	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno: Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	4	4	4	3	2	0
Antígeno: Neurovacuna virulento, al 1/3.	4	4	4	4	3	2	1	0
Antígeno: Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	3	3	1
Control suero...	1	±	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 8.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera. ... ... Título 1/80
Con antígeno de neurovacuna virulento (soluble)... ... ... — 1/40
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... — 1/80

Suero número 9.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *embrión de pollo* en glicerina y veronal a pH 6, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *veintiún días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 6	26 mm.	20 mm.	16 mm.	11 mm.	10 mm.
Veronal pH 6.	18 —	15 —	12 —	12 —	6 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero..		Pnto	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	4	4	3	3	2	0
	Neurovacuna virulento, al 1/3.	4	4	4	4	3	2	1	0
	Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	3	2	1
Control suero....		1	±	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 9.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera. ... ... Título 1/80
Con antígeno de neurovacuna virulento (soluble)... ... ... — 1/40
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... — 1/80

Suero número 10.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de embrión de pollo en glicerina y veronal a pH 6, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *veintitres días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 6	22 mm.	18 mm.	13 mm.	11 mm.	10 mm.
Veronal pH 6.	21 —	18 —	16 —	13 —	8 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/110
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera al 1/7...	4	4	4	4	4	3	2	1	0
	Neurovacuna virulento, al 1/3...	4	4	4	4	4	3	2	±	0
	Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	4	2	2	1
Control suero.		0	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 10.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera. ... ... Título 1/80
Con antígeno de neurovacuna virulento (soluble)... ... ... — 1/80
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... — 1/100

Suero número 11.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de embrión de pollo en glicerina y veronal a pH 8 en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *veintitrés días* de su inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 8	32 mm.	26 mm.	23 mm.	22 mm.	10 mm.
Veronal pH 8.	24 —	23 —	19 —	16 —	10 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/110
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera al 1/7...	4	4	4	4	4	4	3	2	1
	Cerebro virulento de ratón *b)*, al 1/3	4	3	3	2	±	0	0	0	0
	Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	4	3	2	2
Control suero.		0	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 11.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera ... ... Título 1/100
Con antígeno de cerebro virulento de ratón (b) ... ... — 1/10
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... — 1/110

Suero número 40.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *embrión de pollo* en solución salina, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría primera, a los *ocho días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina	21 mm.	18 mm.	6 mm.	3 mm.	0 mm.

Titulación del suero.

Diluciones del suero...		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno pulpa vacunal de ternera, al 1/7.	1.ª sangría, a los 8 días.....	4	4	3	3	2	1	0	0
	2.ª " 200 "	2	2	±	0	0	0	0	0
	3.ª " 265 "	2	±	0	0	0	0	0	0
	4.ª " 280 "	2	±	0	0	0	0	0	0
	5.ª " 295 "	2	±	0	0	0	0	0	0
Antígeno de membranas alantoideas, al 1/6.	1.ª sangría, a los 8 días.....	4	4	4	4	3	2	1	0
	2.ª " 200 "	3	2	2	1	0	0	0	0
	3.ª " 265 "	2	2	1	0	0	0	0	0
	4.ª " 280 "	2	1	1	0	0	0	0	0
	5.ª " 295 "	2	1	0	0	0	0	0	0
Control suero		0	0	0	0	0	0	0	0

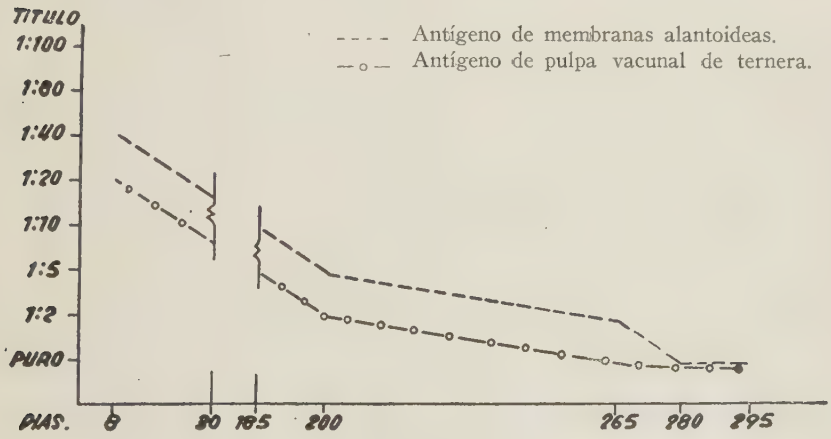
Resultados obtenidos con el suero número 40.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera:

Primera sangría, a los ocho días	Título	1/20
Segunda sangría, a los doscientos días.	—	1/2
Tercera sangría, a los doscientos sesenta y cinco días ...	—	puro
Cuarta sangría, a los doscientos ochenta días...	—	puro
Quinta sangría, a los doscientos noventa y cinco días ...	—	puro

Con antígeno de membranas alantoideas:

Primera sangría, a los ocho días	Título	1/40
Segunda sangría, a los doscientos días.	—	1/5
Tercera sangría, a los doscientos sesenta y cinco días ...	—	1/2
Cuarta sangría, a los doscientos ochenta días...	—	puro
Quinta sangría, a los doscientos noventa y cinco días ...	—	puro



Curva 1.

Suero número 12.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *membranas alantoideas* en glicerina y veronal a pH 7, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *veinticinco días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 7	34 mm.	28 mm.	24 mm.	18 mm.	12 mm.
Veronal pH 7.	35 —	29 —	20 —	18 —	11 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/110
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera al 1/7...	4	4	4	4	4	3	2	1	0
	Cerebro virulento de ratón *b)*, al 1/3	4	4	3	2	2	1	±	0	0
	Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	4	3	2	1
Control suero.		0	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 12.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera ... ... Título 1/80
Con antígeno de cerebro virulento de ratón (b) ... ... — 1/20
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... — 1/100

Suero número 13.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *membranas alantoideas* en glicerina y veronal a pH 8, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *veinticinco días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 8	35 mm.	30 mm.	26 mm.	22 mm.	13 mm.
Veronal pH 8.	35 —	28 —	25 —	20 —	10 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	4	4	3	2	1	0
	Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	4	3	1
Control suero.		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 13.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera ... ... Título 1/40
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides... ... ... — 1/80

Suero número 17.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *membranas alantoideas* en glicerina y veronal a pH 8, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *veintiún días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 8	32 mm.	25 mm.	20 mm.	17 mm.	10 mm.
Veronal pH 8.	30 —	24 —	18 —	15 —	9 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo y alantoides, al 1/6...	4	4	4	4	4	3	2	1
Control suero.	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 17.

Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... Título 1/80

Suero número 18.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *membranas alantoideas* en glicerina y veronal a pH 9, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Sangría, a los *veintiún días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 9	34 mm.	23 mm.	18 mm.	15 mm.	12 mm.
Veronal pH 9.	30 —	22 —	19 —	14 —	13 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo y alantoides, al 1/6...	4	4	4	3	3	3	2	1
Control suero	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 18.

Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... Título 1/80

Suero número 14.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *vísceras de embrión de pollo* en glicerina y veronal a pH 6, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *veinticinco días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 6	26 mm.	20 mm.	18 mm.	13 mm.	6 mm.
Veronal pH 6.	24 —	21 —	17 —	12 —	8 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/110
Antígeno de embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	4	3	2	±
Control suero	2	1	±	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 14.

Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... Título 1/100

Suero con poder anticomplementario.

Suero número 19.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *vísceras de embrión de pollo* en glicerina y veronal a pH 5, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000, 1/1000.000. Virus activo. Sangría, a los *veinte días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 5	18 mm.	14 mm.	10 mm.	0 mm.	0 mm.
Veronal pH 5.	±	0 —	0 —	0 —	0 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo y alantoides, al 1/6...	4	4	4	4	4	3	2	±
Control suero.	3	2	1	1	±	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 19.

Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... Título 1/80

Suero con poder anticomplementario.

El poder anticomplementario se manifestó igualmente con los antígenos de pulpa vacunal de ternera y de neurovacuna virulento (soluble).

Suero número 20.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *vísceras de embrión de pollo* en glicerina y veronal a pH 9, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000, después de *once días a la temperatura ambiente*. Sangría, a los *veinte días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 9	20 mm.	13 mm.	7 mm.	6 mm.	5 mm.
Veronal pH 9.	13 —	8 —	±	±	±

Titulación del suero.

Diluciones del suero...		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	4	4	3	3	1	0
	Neurovacuna virulento, al 1/3.	4	4	4	4	2	1	0	0
	Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	3	2	1
Control suero.		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 20.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera ... ... Título 1/40
Con antígeno de neurovacuna virulento (soluble)... ... ... — 1/20
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... — 1/80

Suero número 15

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *cuerpos de embriones de pollo* en glicerina y veronal a pH 5, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000, 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *veintiún días* de su inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 5	28 mm.	20 mm.	17 mm.	12 mm.	6 mm.
Veronal pH 5.	28 —	20 —	15 —	13 —	7 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero	Puro	1,2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100	1/110
Antígeno de embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	4	3	2	1
Control suero	3	2	2	1	±	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 15.

Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... Título 1/100

Suero con poder anticomplementario.

Suero número 16.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de cuerpos de embriones de pollo en glicerina y veronal a pH 8, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000. Virus activo. Sangría, a los *veintidós días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 8	30 mm.	25 mm.	22 mm.	14 mm.	10 mm.
Veronal pH 8	28 —	24 —	21 —	16 —	10 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo y alantoides, al 1/6...	4	4	4	4	4	3	1	0
Control suero.	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 16.

Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... Título 1/40

Suero número 21.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *cuerpos de embriones de pollo* en glicerina y veronal a pH 5, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000, después de *diez días a la temperatura ambiente*. Sangría, a los *veinte días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 5	9 mm.	0 mm.	0 mm.	0 mm.	0 mm.
Veronal pH 5.	11 —	10 —	0 —	0 —	0 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo y alantoides, al 1/6...	4	4	4	4	4	3	1	±
Control suero.	3	3	1	1	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 21.

Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... Título 1/40

Presenta poder anticomplementario, confirmado con los antígenos de pulpa vacunal de ternera y de neurovacuna virulento (soluble).

Suero número 22.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *cuerpos de embriones de pollo* en glicerina y veronal a pH 6, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000, después de *catorce días a la temperatura ambiente*. Sangría, a los *veinticinco días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Glicerina pH 6	12 mm.	6 mm.	0 mm.	0 mm.	0 mm.
Veronal pH 6.	28 —	15 —	6 —	4 —	0 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de pulpa vacunal de ternera al 1/7...	4	4	4	4	3	2	±	0
Control suero.	3	3	2	±	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 22.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera ... ... Título 1/40

Presenta poder anticomplementario.

Suero número 32.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *embrión de pollo* en glicerina a pH 5, 6 y 7, en las suspensiones de 1/100, 1/1.000 y 1/10.000. Virus activo.

A los *cuarenta y dos días,* se le practican tres inyecciones intraperitoneales de 1, 2 y 4 c. c. de una suspensión de triturado de *neurovacuna al 1/10,* con intervalos de *diez días.* A los *diez días* de la última inyección, y a los *setenta y dos* de la inoculación intradérmica, sangría a muerte.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Glicerina pH 5	10 mm.	10 mm.	10 mm.
Glicerina pH 6	20 —	20 —	15 —
Glicerina pH 7	20 —	15 —	10 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	4	4	3	3	2	1
	Neurovacuna avirulento, puro.	3	3	2	2	0	0	0	0
	Neurovacuna virulento, al 1/3.	4	4	4	3	2	1	0	0
	Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	3	3	2	0
Control suero		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 32.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera. ... ... Título 1/80
Con antígeno de neurovacuna avirulento (purificado). ... — 1/10
Con antígeno de neurovacuna virulento (soluble)... ... ... — 1/20
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides ... ... — 1/80

Suero número 33.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *embrión de pollo* en cisteína a pH 5 y 6, en las diluciones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000. Virus activo.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Cisteína pH 5	15 mm.	13 mm.	7 mm.	3 mm.
Cisteína pH 6	18 —	15 —	12 —	12 —

A los *cincuenta y dos días* se le practican tres inyecciones intraperitoneales de 1, 2 y 4 c. c., de una suspensión de triturado de *neurovacuna al 1/10,* con intervalos de *diez días.* A los *veinticuatro días* de la última inyección y a los *noventa y seis* de la inoculación intradérmica, sangría a muerte.

Titulación del suero.

	Diluciones del suero	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	4	4	3	3	2	1
	Neurovacuna avirulento, puro.	1	0	0	0	0	0	0	0
	Neurovacuna virulento, al 1/3.	4	3	3	1	0	0	0	0
	Cerebro virulento de ratón (b), al 1/5	3	3	2	2	1	0	0	0
	Embrión de pollo y alantoides, al 1/6	4	4	4	4	4	3	2	1
	Control suero...	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 33.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera. ... ... Título 1/80
Con antígeno de neurovacuna avirulento (purificado) ... — 0
Con antígeno de neurovacuna virulento (soluble)... ... ... — 1/5
Con antígeno de cerebro virulento de ratón (b)... ... ... — 1/10
Con antígeno de embrión de pollo y alantoides... ... ... — 1/80

Suero número 47.

Procedente de un conejo al que se le practicaron tres inyecciones subcutáneas de 1, 2 y 4 c. c., de una suspensión de triturado de *neurovacuna al 1/10,* con intervalos de cuatro días. A los *cuatro días* de la última, una inyección intraperitoneal de 6 c. c. y a los *cuatro días* de ésta, inoculación intracerebral con 0,30 c. c. de la misma suspensión de neurovacuna al 1/10. Sangría a los *diez días* de esta última. (A los veintiséis días de la primera inoculación.)

Titulación del suero.

Diluciones del suero	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Neurovacuna virulento, al 1/3. ...	4	4	4	3	3	2	1	0
Control suero	3	2	1	±	±	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 47.

Con antígeno de neurovacuna virulento (soluble) ... ... Título 1/40

Suero con poder anticomplementario.

Suero número 48.

Procedente de un conejo inoculado en las mismas condiciones que el anterior. Sangría, a los *veinticuatro días* de la inoculación intracerebral. (A los cuarenta días de la primera inoculación.)

TITULACIÓN DEL SUERO.

Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno	Pulpa vacunal de ternera, al 1/7	4	4	4	4	3	2	2	0
	Neurovacuna avirulento, puro.	3	3	2	2	1	1	0	0
	Neurovacuna virulento, al 1/3	4	4	4	3	2	2	1	0
Control suero..		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 48.

Con antígeno de pulpa vacunal de ternera. ... ... Título 1/80
Con antígeno de neurovacuna avirulento (purificado).. ... — 1/10
Con antígeno de neurovacuna virulento (soluble) ... ... — 1/40

Suero número 23.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de cerebro de ratón, en las supensiones de 1/100, 1/1.000, 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000, en solución salina. Virus activo. Sangría a los *veinte días* de la inoculación, repitiéndose ésta cada diez días. Muere después de la tercera sangría.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Solución salina...	27 mm.	26 mm.	25 mm.	23 mm.	20 mm.

Titulación del suero.

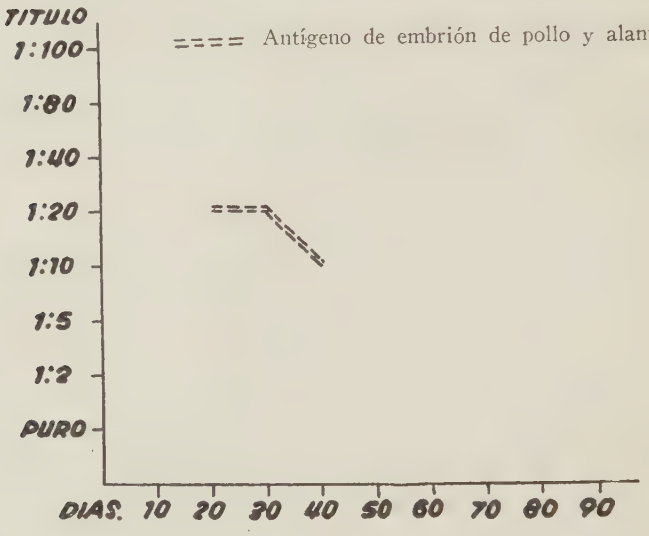
Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo y alantoides, al 1/6	1.ª sangría, a los 20 días.....	4	4	4	3	2	1	0	0
	2.ª " 30 "	4	4	4	2	2	0	0	0
	3.ª " 40 "	4	4	3	2	0	0	0	0
Control suero.		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 23.

Con antígeno de embrión de pollo y alantoides:

Primera sangría a los veinte días ... ... Título 1/20
Segunda sangría a los treinta días ... ... — 1/20
Tercera sangría a los cuarenta días ... ... — 1/10

Muere el conejo a los cuarenta y tres días.



Curva 2.

Suero número 27.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con triturados de testículo de conejo (testículo A inoculado al 1/100.000 y testículo B, inoculado al 1/800), en las suspensiones de 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000 en solución salina. Virus activo. Sangría a los *veinte días* de su inoculación, repitiéndose ésta cada diez días.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Testículo A...	20 mm.	18 mm.	12 mm.
Testículo B...	18 —	16 —	11 -

Titulación del suero.

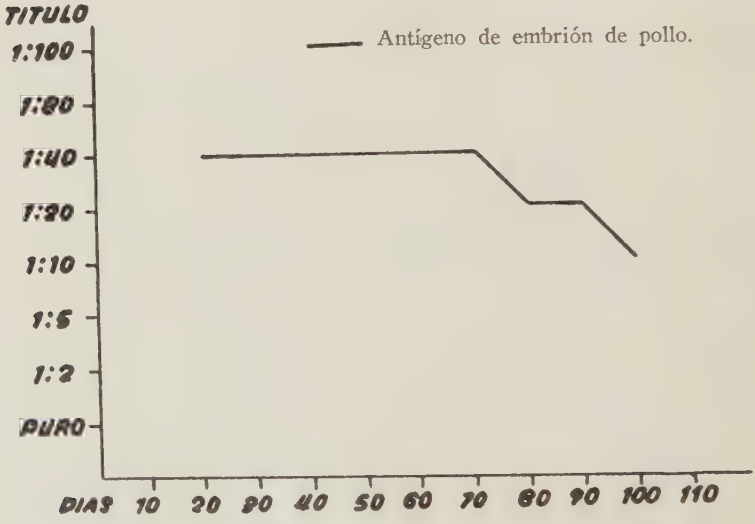
Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo, al 1/5.	1.ª sangría, a los 20 días.....	4	4	4	4	3	2	0	0
	2.ª " 30 "	4	4	4	4	4	2	1	0
	3.ª " 40 "	4	4	4	4	3	2	1	0
	4.ª " 50 "	4	4	4	3	3	2	0	0
	5.ª " 60 "	4	4	4	3	2	2	0	0
	6.ª " 70 "	4	4	4	3	2	2	0	0
	7.ª " 80 "	3	3	3	3	2	1	0	0
	8.ª " 90 "	3	3	3	2	2	±	0	0
	9.ª " 100 "	3	3	2	2	0	0	0	0
Control suero.		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 27.

Con antígeno de embrión de pollo:

Primera sangría, a los veinte días...	Título	1/40
Segunda sangría, a los treinta días	—	1/40
Tercera sangría, a los cuarenta días	—	1/40
Cuarta sangría, a los cincuenta días	—	1/40
Quinta sangría, a los sesenta días	—	1/40
Sexta sangría, a los setenta días	—	1/40
Séptima sangría, a los ochenta días	—	1/20
Octava sangría, a los noventa días...	—	1/20
Novena sangría, a los cien días	—	1/10

Muere a los ciento ocho días.



Curva 3.

Suero número 25.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *hígado de un conejo* (inoculado en piel con neurovacuna) y otro triturado de *cerebro de un conejo* (inoculado en piel con neurovacuna), en las suspensiones de 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000 en solución salina. Virus activo. Sangría a los *sesenta días* de la inoculación.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Cerebro	14 mm.	12 mm.	10 mm.
Hígado	0 —	0 —	0 —

Titulación del suero.

Diluciones del suero	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo, al 1/5....	4	4	4	3	1	0	0	0
Control suero.	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 25.

Con antígeno de embrión de pollo... ... ... Título 1/10

Muere a los sesenta y cinco días.

Suero número 45.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con un triturado de *bazo* y un triturado de *testículo de conejo,* en las suspensiones de 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000 en solución salina. (De un animal inoculado con neurovacuna.) Sangría a los *setenta días* de la inoculación, repitiéndose ésta cada veinte días. Muere después de la tercera sangría.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Testículo.	0 mm.	0 mm.	0 mm.
Bazo...	0 —	0 —	0 —

Titulación del suero.

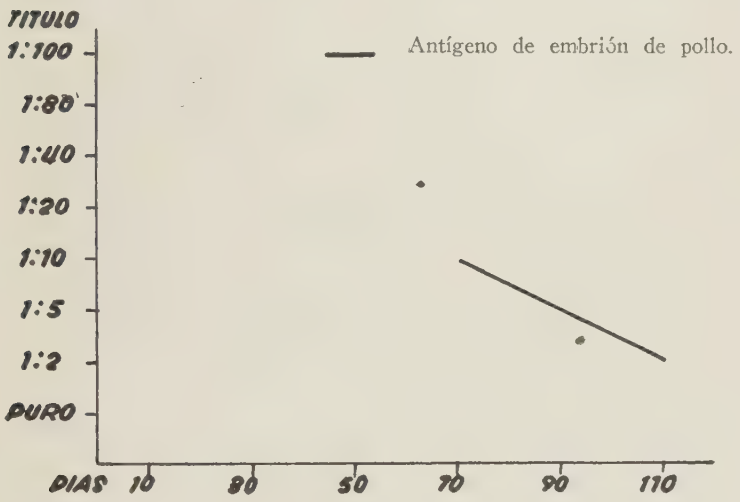
Diluciones del suero		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo, al 1/5.	1.ª sangría, a los 70 días.....	3	3	2	2	1	±	0	0
	2.ª " 90 "	3	2	2	1	0	0	0	0
	3.ª " 110 "	3	2	0	0	0	0	0	0
Control suero...		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 45.

Con antígeno de embrión de pollo:

Primera sangría, a los setenta días ... ... Título 1/10
Segunda sangría, a los noventa días ... ... — 1/5
Tercera sangría, a los ciento diez días ... ... — 1/2

Muere a los ciento diecisiete días.



Curva 4.

Suero número 46.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con unos triturados de *cerebro e hígado* (de animal inoculado en piel con neurovacuna), en las suspensiones de 1/10.000, 1/100.000 y 1/1.000.000 en solución salina. Sangría a los *veinte días* de la inoculación, repitiéndose ésta cada diez días.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Cerebro	0 mm.	0 mm.	0 mm.
Hígado	0 —	0 —	0 —

Titulación del suero.

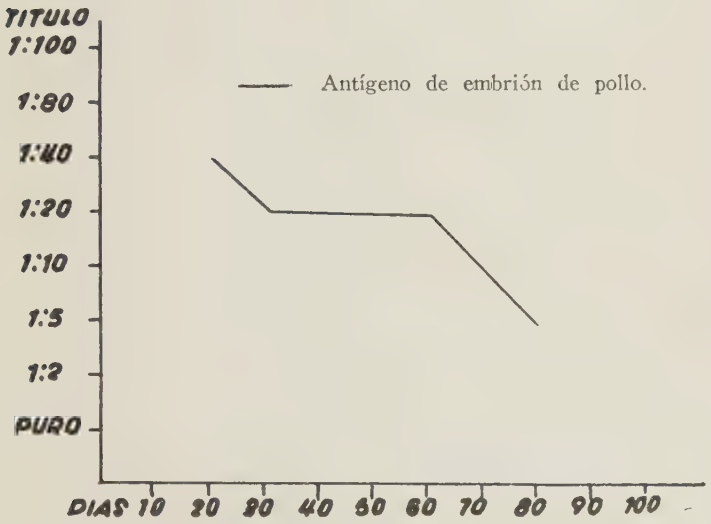
Diluciones del suero...		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo, al 1/5.	1.ª sangría, a los 20 días.....	4	4	4	4	3	3	1	0
	2.ª " 30 "	4	4	4	3	2	1	0	0
	3.ª " 40 "	4	4	4	3	3	1	0	0
	4.ª " 50 "	4	4	4	3	3	1	0	0
	5.ª " 60 "	4	3	3	2	2	±	0	0
	6.ª " 70 "	3	3	3	2	1	0	0	0
	7.ª " 80 "	3	3	2	1	0	0	0	0
Control suero...		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 46.

Con antígeno de embrión de pollo:

Primera sangría, a los veinte días...	Título	1/40
Segunda sangría, a los treinta días	—	1/20
Tercera sangría, a los cuarenta días	—	1/20
Cuarta sangría, a los cincuenta días	—	1/20
Quinta sangría, a los sesenta días...	—	1/20
Sexta sangría, a los setenta días	—	1/10
Séptima sangría, a los ochenta días	—	1/5

Muere a los ochenta y cuatro días.



Curva 5.

Suero número 28.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con triturados de *neurovacuna* y *pulpa vacunal de ternera,* en las supensiones de 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000 en solución salina, después de *veinticuatro horas en incubación a 37° C.* Sangría a los *veinte días* de la inoculación, repitiéndose ésta cada diez días.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Neurovacuna	19 mm.	19 mm.	16 mm.	10 mm.	8 mm.
Pulpa vacunal de ternera.	31 —	22 —	19 —	18 —	13 —

Titulación del suero.

Diluciones	Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo, al 1/5. 1.ª sangría, a los 20 días.....	4	4	4	3	2	2	0	0
2.ª " 30 "	4	4	4	2	2	1	0	0
3.ª " 40 "	4	4	3	2	2	0	0	0
4.ª " 50 "	4	3	2	2	1	0	0	0
5.ª " 60 "	3	3	2	2	1	0	0	0
6.ª " 70 "	3	2	2	2	1	0	0	0
7.ª " 80 "	3	2	2	2	1	0	0	0
8.ª " 90 "	3	2	2	1	0	0	0	0
9.ª " 100 "	3	2	2	1	0	0	0	0
10.ª " 110 "	3	2	2	1	0	0	0	0
11.ª " 150 "	3	2	2	1	0	0	0	0
12.ª " 160 "	3	2	1	0	0	0	0	0
13.ª " 170 "	2	1	0	0	0	0	0	0
14.ª " 180 "	±	0	0	0	0	0	0	0
Testículo de conejo, al 1/6. 14.ª sangría, a los 180 días ...	±	0	0	0	0	0	0	0
Control suero...	0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 28.

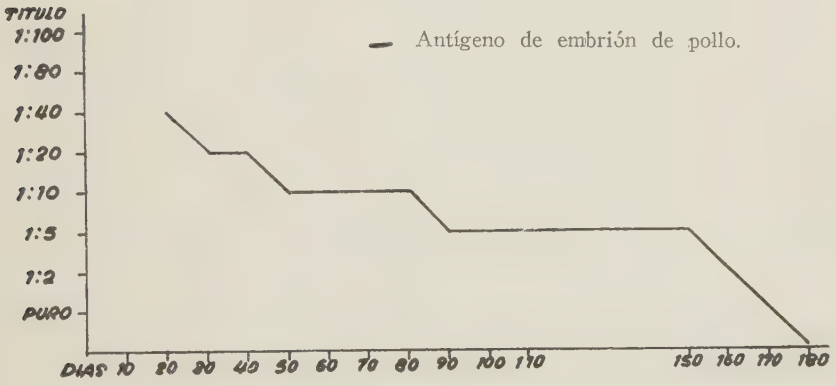
Con antígeno de embrión de pollo:

Primera sangría, a los veinte días...	Título 1/40
Segunda sangría, a los treinta días	— 1/20
Tercera sangría, a los cuarenta días	— 1/20
Cuarta sangría, a los cincuenta días	— 1/10
Quinta sangría, a los sesenta días	— 1/10
Sexta sangría, a los setenta días	— 1/10
Séptima sangría, a los ochenta días	— 1/10
Octava sangría, a los noventa días...	— 1/5
Novena sangría, a los cien días	— 1/5
Décima sangría, a los ciento diez días...	— 1/5
Undécima sangría, a los ciento cincuenta días	— 1/5
Duodécima sangría, a los ciento sesenta días...	— 1/2
Décimotercera sangría, a los ciento setenta días	— puro.
Décimocuarta sangría, a los ciento ochenta días...	Título o (*)

Con antígeno de testículo de conejo:

Décimocuarta sangría, a los ciento ochenta días...	— o (*)

Muere a los ciento ochenta y seis días.



CURVA 6.

(*) El suero puro presenta una fijación de ±.

Suero número 29.

Procedente de conejo inoculado intradérmicamente, con triturados de *neurovacuna* y *pulpa vacunal de ternera,* en las supensiones de 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000 y 1/100.000, en solución salina después de *cuarenta y ocho horas en incubación a 37° C.* Sangría a los *veinte días* de la inoculación, repitiéndose ésta cada diez días.

Esquema de las lesiones a los cinco días.

Diluciones.	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Neurovacuna	26 mm.	17 mm.	14 mm.	9 mm.	2 mm.
Pulpa vacunal de ternera	38 —	24 —	22 —	20 —	19 —

Titulación del suero.

Diluciones		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1 40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo, al 1/5.	1.ª sangría, a los 20 días.....	4	3	3	3	2	1	0	0
	2.ª " 30 "	3	3	3	2	2	1	0	0
	3.ª " 40 "	3	3	3	2	2	0	0	0
	4.ª " 50 "	3	3	2	2	1	0	0	0
	5.ª " 60 "	3	3	2	2	1	0	0	0
	6.ª " 70 "	3	3	2	2	±	0	0	0
	7.ª " 80 "	3	3	2	2	1	0	0	0
	8.ª " 90 "	3	3	2	2	0	0	0	0
	9.ª " 100 "	3	2	2	1	0	0	0	0
	10.ª " 150 "	2	2	±	0	0	0	0	0
	11.ª " 160 "	2	1	0	0	0	0	0	0
	12.ª " 170 "	2	±	0	0	0	0	0	0
	13.ª " 180 "	0	0	0	0	0	0	0	0
Embrión de pollo y alantoides, al 1/6									
13.ª sangría, a los 180 días...		±	0	0	0	0	0	0	0
Control suero..		0	0	0	0	0	0	0	0

Resultados obtenidos con el suero número 29.

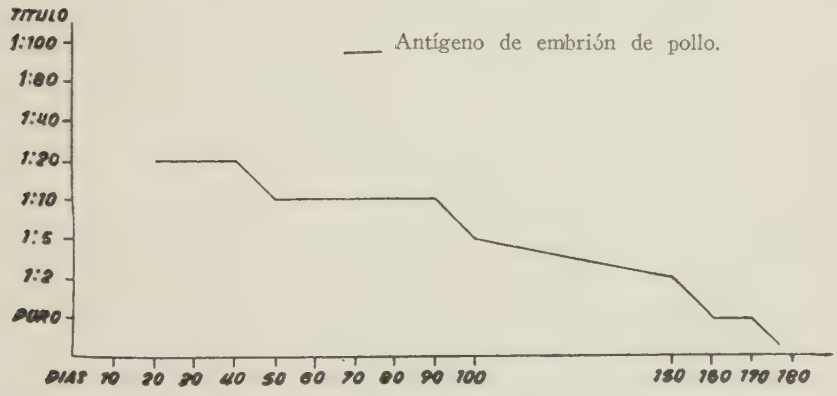
Con antígeno de embrión de pollo:

Primera sangría, a los veinte días	Título	1/20
Segunda sangría, a los treinta días	—	1/20
Tercera sangría, a los cuarenta días	—	1/20
Cuarta sangría, a los cincuenta días	—	1/10
Quinta sangría, a los sesenta días	—	1/10
Sexta sangría, a los setenta días	—	1/10
Séptima sangría, a los ochenta días	—	1/10
Octava sangría, a los noventa días...	—	1/10
Novena sangría, a los cien días	—	1/5
Décima sangría, a los ciento cincuenta días	—	1/2
Undécima sangría, a los ciento sesenta días	—	puro.
Duodécima sangría, a los ciento setenta días...	—	puro.
Décimotercera sangría, a los ciento ochenta días	—	0

Con antígeno de embrión de pollo y alantoides:

Décimotercera sangría a los ciento ochenta días ... ... Titulo 0 (*)

Muere después de los ciento ochenta días.



CURVA 7.

(*) El suero puro presenta una fijación de ±.

Suero número 24.

Procedente de conejo inoculado por el método de *escarificación cutánea,* con una suspensión al 1/10 en glicerina a pH 8 de triturado de pulpa vacunal de ternera. Virus activo. El animal presentó a los cuatro días una erupción confluente y fiebre. Primera sangría, a los *cincuenta y cinco días* de la inoculación, repitiéndose ésta cada quince días.

TITULACIÓN DEL SUERO.

Diluciones		Puro	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/100
Antígeno de embrión de pollo y alantoides, al 1/6.	1.ª sangría, a los 55 días.....	4	4	4	4	4	3	2	1
	2.ª " 70 "	4	4	4	3	3	2	1	0
	3.ª " 85 "	4	4	4	3	2	2	0	0
	4.ª " 100 "	4	4	3	3	2	1	0	0
Antígeno de embrión de pollo, al 1/5.	5.ª " 115 "	4	4	3	2	1	0	0	0
	6.ª " 130 "	4	3	2	2	1	0	0	0
	7.ª " 145 "	4	3	3	2	1	0	0	0
	8.ª " 160 "	3	3	2	1	0	0	0	0
	9.ª " 175 "	3	2	2	0	0	0	0	0
	10.ª " 190 "	3	2	1	0	0	0	0	0
	11.ª " 205 "	3	2	±	0	0	0	0	0
	12.ª " 220 "	2	2	±	0	0	0	0	0
	13.ª " 235 "	2	2	0	0	0	0	0	0
	14.ª " 250 "	2	1	0	0	0	0	0	0
Control suero		0	0	0	0	0	0	0	0

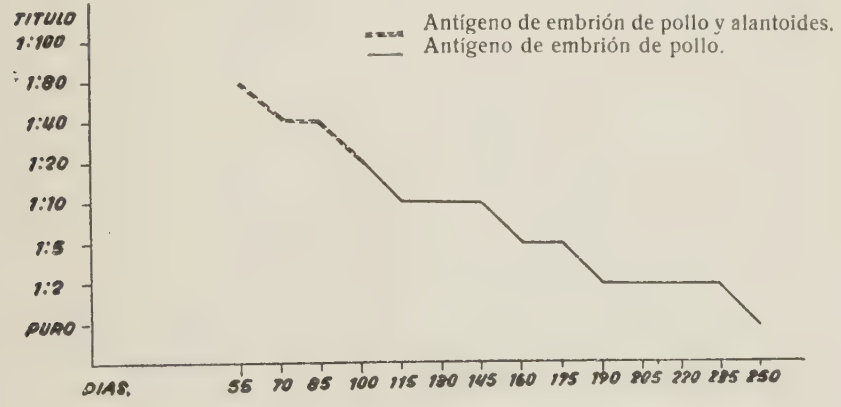
Resultados obtenidos con el suero número 24.

Con antígeno de embrión de pollo y alantoides:

Primera sangría, a los cincuenta y cinco días	Título	1/80
Segunda sangría, a los setenta días	—	1/40
Tercera sangría, a los ochenta y cinco días...	—	1/40
Cuarta sangría, a los cien días	—	1/20

Con antígeno de embrión de pollo:

Quinta sangría, a los ciento quince días...	Título	1/10
Sexta sangría, a los ciento treinta días	—	1/10
Séptima sangría, a los ciento cuarenta y cinco días... ...	—	1/10
Octava sangría, a los ciento sesenta días	—	1/5
Novena sangría, a los ciento setenta y cinco días	—	1/5
Décima sangría, a los ciento noventa días	—	1/2
Undécima sangría, a los doscientos cinco días	—	1/2
Duodécima sangría, a los doscientos veinte días	—	1/2
Décimotercera sangría, a los doscientos treinta y cinco días	—	1/2
Décimocuarta sangría, a los doscientos cincuenta días...	—	puro.



Curva 8

(Continuará.)

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE TRIPTOFANO EN LOS TALLOS DE OLIVO Y LA LOCALIZACION DE LOS TUMORES BACTERIANOS *

POR
R. BELTRÁ

Berthelot, A., y Amoreaux, G., en 1938, probaron que el *Agrobacterium tumefaciens,* en medios de cultivo que contenían triptofano, producía sustancias que, en dosis bajas, eran capaces de estimular la proliferación de las células vegetales. Por otra parte, Link, G. (1937), Kulescha, Z. (1949), y Kulescha, Z., y Gautheret, R. (1948), vieron que los tejidos del *crown-gall* contenían una cantidad de ácido beta-indolacético (A. I. A) suficiente para producir una proliferación celular muy intensa. Como consecuencia de estos resultados se ha admitido en años posteriores que el desarrollo tumoral, en el cáncer vegetal, fuera en parte debido a la acción directa del A. I. A. elaborado por la bacteria, no sabiéndose con seguridad actualmente cuál es el origen de dicha sustancia, aunque se admita como fuente más probable el triptofano.

La hipótesis de que el triptofano pueda ser el precursor primario del A. I. A. viene desde los trabajos de Dolk, Nielsen y Thimann, que culminaron con el aislamiento y caracterización del A. I. A., a partir de cultivos de *Rhizopus* por Thimann en 1935, postulándose posteriormente que el rendimiento de los cultivos en A. I. A. dependía de la cantidad de triptofano y dándose por Thimann en 1956 diferentes vías de formación para el A. I. A., pero en las que intervienen siempre el triptofano, más o menos directamente. En los tejidos sanos de vege-

(*) Trabajo presentado al VII Congreso Internacional de Microbiología de Estocolmo.

tales ya ha sido indicada por Yamaki y Nakamura en 1952, una vía de formación semejante, pues creen estos autores que el A. I. A., que se encuentra en el endosperma del maíz, se produce *in situ* a partir de las proteínas que contienen triptofano, quedando así admitidos como posibles precursores del A. I. A. los complejos proteínicos en los que entra a formar parte el triptofano.

Al trabajar nosotros con la bacteria *Pseudomonas savastanoi,* productora de tumores típicos en el olivo, comprobamos que dicha bacteria, en medios de cultivo con triptofano, producía A. I. A. (*), así como posteriormente se vió que los tumores del olivo contenían A. I. A. (**); la consideración de estos hechos nos llevó al presente trabajo, por el que tratamos de aclarar el posible origen del A. I. A. que se encuentra presente en los tumores del olivo. Estudiamos la concentración de triptofano, como posible precursor del A. I. A., en los tallos de olivo sanos y en los tallos donde se asientan los tumores y la relación entre la localización de estos tumores y la concentración de triptofano en los tallos.

PARTE EXPERIMENTAL

Esta parte experimental comprende pruebas histológicas y bioquímicas, con las que se ha tratado de investigar la presencia de triptofano en tallos sanos e infectados por el *Pseudomonas savastanoi.*

En las pruebas citoquímicas, por la reacción de Berg (1926), se ha podido demostrar *in situ,* en las secciones de tejidos, la presencia de proteínas que contienen alfa-aminoácidos, pues éstas, por acción de la ninhidrina, sufren desaminación oxidativa, y posteriormente el aldehido formado se condensa con el producto de reacción de la ninhidrina para dar color azul. Como esta prueba no es específica para el triptofano, se han confirmado los resultados obtenidos con otras pruebas que sí lo son para el aminoácido buscado, como es la reacción de Romieu, (1925), que, aunque al principio no se consideró específica para un aminoácido determinado, en 1931, Blanchetière y Romieu, demostraron que el color

(*) En prensa. Trabajo presentado al II Congreso Latinoamericano de Microbiología (Méjico).

(**) Sin publicar.

rojizo violeta obtenido en dicha reacción se debía a la presencia de grupos de triptofano en la molécula de proteína.

Aunque se sabe que el triptofano es un constituyente general de las proteínas, se ha visto que en algunos casos no está presente en cantidad apreciable, y éste ha sido el motivo por el que el triptofano de los tallos se haya separado por dos técnicas distintas: por extracción con agua bidestilada, precipitación de la fracción proteica con acetona, hidrolisis alcalina y adsorción y elución en condiciones adecuadas del hidrolizado obtenido, por una columna de adsorción de aminoácidos aromáticos, de carbón activo 50 XP; la otra técnica, seguida sin ninguna modificación, fué la de Yamaki y Nakamura (1952).

Los eluatos y extractos obtenidos por estas técnicas fueron estudiados frente a determinados reactivos específicos, intentando posteriormente la identificación del triptofano por cromatografía.

I) *Pruebas histológicas.*

A) *Cortes histológicos.*

Con un microtomo de congelación, se hicieron los cortes siguientes: 1.º Secciones de tallos sanos; 2.º, secciones de tallos próximos a los tumores, y 3.º, secciones de tallos donde se asientan los tumores.

B) *Prueba de la ninhidrina de Berg* (1926).

En los tejidos fijados con formalina al 10 % se siguió la reacción de Berg, usando ninhidrina al 0,2 %; los resultados que obtuvimos fueron los siguientes:

1.º En los cortes de tallos sanos se observó una coloración pardo-azulada clara, indicadora de una escasa concentración de proteínas.

2.º En las secciones de tallos próximos a los tumores se apreció una coloración azul violeta, indicando con ello una concentración mayor en proteínas.

3.º En los tallos propiamente tumorales los resultados fueron semejantes a los anteriores.

También se ha seguido esta técnica con las modificaciones dadas por Serra y Queiroz Lopes (1945), que usan una mezcla de ninhidrina al 0,4 % y fosfato buffer de pH 6,98. Los resultados obtenidos son muy

parecidos a los obtenidos con la técnica sin modificar, aunque hemos encontrado algunas ventajas, como es, que los cortes se conservan mucho mejor, ya que al calentarlos en un vidrio de reloj sobre agua hirviendo, con el reactivo, no se deterioran tanto como cuando se hierven por un minuto con dicho reactivo, según indica Berg en su técnica; el color que toman las secciones por el método modificado es más homogéneo y menos intenso, pudiéndose distinguir mejor la intensidad de coloración, como nos interesa en este caso particular.

C) *Reacción de Romieu (1925).*

Se ha trabajado, como en el caso anterior, con secciones de tallos sanos, de tallos próximos a los tumores y en los que se asientan dichas tumoraciones previamente fijadas con formalina. En esta reacción hemos tenido que obtener por tanteo cuál era el tiempo favorable de calentamiento a 55° C. de los cortes con el reactivo; de los tiempos ensayados 2-5-7-10-12 y 15', entre diez y doce minutos obtuvimos, en las secciones de tallos sanos, una coloración rojiza amarillenta muy clara; en las secciones de tallos muy próximas al tumor, intensa coloración rojiza, y en la zona tumoral del tallo se produjo también color rojizo, pero menos intensa que en la zona anterior y nunca igual a la obtenida en la sección de tallos sanos. Con los otros tiempos ensayados obtuvimos coloraciones poco diferenciales.

II) *Pruebas bioquímicas.*

A) *Preparación de eluatos y extractos de tallos de olivo.*

Primeramente se ha procedido al aislamiento del posible triptofano presente en los tres tipos de tallos citados anteriormente. Se han seguido dos técnicas distintas:

a) En la primera técnica se han seguido los siguientes pasos: 1.°, extracción de los tallos con agua bidestilada; 2.°, precipitación de la fracción proteica con acetona; 3.°, hidrolisis alcalina del precipitado proteico obtenido, y 4.°, adsorción y elución del triptofano, partiendo del hidrolizado, en una columna de adsorción de carbón activo 50 XP, para aminoácidos aromáticos.

Cincuenta gramos de tallos de las tres zonas se trituraron por separado en un mortero, hasta desmenuzarlos, y después se llevaron a un turmix con 200 c. c. de agua bidestilada, donde se trituraron durante diez minutos; 100 c. c. del filtrado que obtuvimos se enfriaron a temperatura muy baja, por una mezcla de nieve carbónica y acetona, y se precipitaron con 300 c. c. de acetona enfriada por el mismo procedimiento; con los 200 c. c. de acetona que se añadieron posteriormente, no obtuvimos precipitado alguno.

Las fracciones probablemente proteicas que obtuvimos se hidrolizaron hirviendo con hidróxido bárico 4N durante diez-doce horas, obteniéndose un hidrolizado incoloro; se ha recurrido a la hidrolisis alcalina porque por hidrolisis ácida se destruye parcialmente el triptofano, mientras que en el hidrolizado alcalino permanece inalterado y sin embargo se destruyen la cisteína, serina, treonina, arginina etc., simplificándose con ello el problema por posible enmascaramiento de los resultados. Se evita también la formación de humina, sustancia oscura que aparece siempre en los hidrolizados ácidos de proteínas que contienen triptofano y que se cree que son productos de descomposición del triptofano.

El hidrolizado alcalino obtenido se hizo pasar por una columna de adsorción que contenía el adsorbente debidamente preparado y en el cual fué adsorbida la fracción de aminoácidos aromáticos del hidrolizado, eluyéndose posteriormente el triptofano libre con 225 c. c. de agua destilada saturada de acetato de etilo e hidrógeno sulfurado.

Algunos autores proponen eluir los aminoácidos aromáticos con una solución de fenol al 5 % en una solución acuosa de ácido acético al 20 %; pero en estas condiciones el triptofano se destruye totalmente.

Los tres eluatos obtenidos de los tallos sanos, próximos a los tumores y de los propiamente tumorales, se guardaron en nevera hasta su posterior estudio bioquímico.

b) La otra técnica que se siguió para la extracción del triptofano de los tallos se realizó por la técnica de Yamaki y Nakamura (1952) sin ninguna modificación.

B) *Comportamiento bioquímico de los eluatos y extractos.*

El triptofano que pudiera estar presente en los eluatos obtenidos de la columna de adsorción y de los extractos según la técnica de Yamaki

y Nakamura se caracterizó químicamente por pruebas colorimétricas; los reactivos probados fueron: paradimetilaminobenzaldehido (p-DABA) Salkowski, Hopkins-Cole, agua de bromo y formaldehido.

TABLA I

Resultados de las reacciones colorimétricas de los eluatos y extractos y del triptofano químicamente puro frente a los reactivos citados.

Eluatos y extractos problema		REACTIVOS				
		p-DABA	Salkowski	Hopkins-Cole	Agua de bromo	Formaldehido
Eluatos.	Tallos sanos	Amarillo	—	Castaño oscuro	Castaño oscuro	Pardo negruzco
	Tallos próximos a tumores	Amarillo	—	Indicios rojo	Indicios rojo	Indicios azul
	Tallos tumorales	Rosa	—	Rojo violeta	Rojo	Violeta azulado
Extractos.	Tallos sanos	Amarillo	—	Castaño oscuro	Castaño oscuro	Pardo negruzco
	Tallos próximos a tumores	Indicios Rosa	—	Rojo violeta	Rojo	Indicios azul
	Tallos tumorales	Rosa	—	Rojo violeta	Rojo	Violeta azulado
Triptofano (Merck).....		Rosa	—	Rojo violeta	Rojo	Violeta azulado

Parece comprobarse la presencia de triptofano en los extractos y eluatos de los tallos próximos a tumores y en los propiamente tumorales.

C) *Cromatografía de eluatos y extractos.*

La técnica cromatográfica sobre papel que se siguió para detectar el triptofano en los extractos y eluatos, fue de desarrollo descendente, los cromatogramas fueron de papel Whatman n.° 1, de 45 × 13 cm. Como solventes hemos empleado : butanol : agua : ácido acético (60 : 25 : 15), butanol (saturación con NH_3 al 5 %) y propanol — 2 :

amoniaco : agua (80 : 1 :1) y como reveladores, principalmente el reactivo de Ehrlich (0'5 p-DABA, 100 alcohol etílico 95 % y 2 c. c. de SO_4H_2 concent.) y p-DABA en ClH-N al 1 %.

Los Rf de las manchas obtenidas en los cromatogramas, correspondientes a los eluatos y extractos en los solventes indicados, fueron los que se dan en la tabla II.

TABLA II

Valores de Rf de los eluatos y extractos y triptofano puro (Merck) en cromatografía sobre papel con diversos solventes.

	Eluatos y extractos problema	SOLVENTES		
		Butanol (satur. NH_3)	Butanol : agua : ácido acético (60:25:15)	Propanol — 2: amoniaco : agua (80:1:1)
Eluatos.	Tallos sanos	0,43	0,51-0,53	0,44
	Tallos próximos tumores	0,43	0,51-0,54	0,44-0,45
	Tallos tumorales	0,45-0,47	0,52-0,54	0,45
Extractos.	Tallos sanos	0,43-0,44	0,55	0,44
	Tallos próximos tumores	0,43	0,55	0,44
	Tallos tumorales	0,45	0,55	0,48
	Triptofano (Merck)	0,45	0,51-0,55	0,45

En los cromatogramas, en los Rf correspondientes al triptofano puro hemos observado algunas veces dos manchas, cuya formación dicen algunos autores se debe a que el triptofano se presenta en dos formas: una ionizada y otra no.

En los eluatos y extractos tumorales se ha comprobado la presencia de un componente indólico de Rf comprendido entre 0'43-0'55; el que el triptofano puro en las mismas condiciones nos dé un Rf entre 0'45-0'55 nos hace suponer que ese componente, parcialmente identificado como triptofano en las primeras pruebas colorimétricas realizadas con otros reactivos, sea verdaderamente triptofano por la semejanza de los valores de Rf obtenidos.

Asimismo se ha visto por la intensidad de coloración de las manchas obtenidas en los cromatogramas, que la concentración de triptofano es muy superior en los eluatos y extractos correspondientes a las zonas tumorales, que en las de los tejidos sanos, en los que sólo encontramos indicios.

CONCLUSIONES

Por las experiencias anteriores se ha visto que el triptofano no se encuentra repartido uniformemente en los tallos de olivo, pues encontramos que en las zonas de tallos sanos (zonas sin tumores) la concentración de triptofano es escasísima y que esta concentración va aumentando progresivamente según nos aproximamos a las zonas propiamente tumorales del tallo, donde se asientan los tumores.

Puesto que se ha demostrado recientemente que la bacteria *Pseudomonas savastanoi,* en medios de cultivo con triptofano, produce A. I. A. y que los tumores originados por esta bacteria contienen A. I. A., es probable que los tumores de olivo deban en parte su formación al A. I. A., que a su vez creemos puede ser originado por vía enzimática, a partir del triptofano del tallo que como ya hemos dicho se encuentra en mayor concentración en las zonas muy próximas a donde se encuentran los tumores y en las zonas tumorales.

Lo que sí es un hecho cierto es que existe una dependencia entre la concentración de triptofano en los tallos y la localización de los tumores, pudiendo admitirse como posible el hecho de que la menor concentración de triptofano en el jugo celular, como creen Berthelot y Amoreaux, en el caso del *Agrobacterium tumefaciens,* sea entre otros uno de los factores que produzca, en la especie vegetal, cierta inmunidad para el ataque por la bacteria. Queda ahora por aclarar cual es el origen de la diferente concentración de triptofano en los tallos, si se debe a que la bacteria al principio de la infección produce en la célula huésped una sustancia o sustancias difusibles que estimulan la actividad metabólica del tejido en los alrededores de la zona de infección o si se debe a otra causa diferente que esté todavía sin estudiar.

RESUMEN

Se estudia la concentración de triptofano en los tallos sanos de olivo y en los tallos con tumores producidos por el *Pseudomonas savastanoi* y su relación con los tumores, creyéndose que la concentración de triptofano en los tallos influye en la localización y producción de los tumores bacterianos que contienen A. I. A.

SUMMARY

We study the concentration of tryptophane in healthy branches of olive trees and the branches with knots produced by *Pseudomonas savastanoi* and their relation with tumors; we think that the concentration of tryptophane in the branch influences on the location and production of bacterious tumors that contain A. I. A.

BIBLIOGRAFIA

Berg, W. 1926. Zum histologischen Nachweis der Eiweisspeicherung in der Leber. Arch. ges Physiol. Pflügers, 214: 243-249.

Berthelot, A. y Amoreaux, G. 1938. Sur la formation d'acide indole-3-acetique dans l'action de *Bacterium tumefaciens* sur le tryptophane. Compt. Rend. Acad. Sci. (París), 206: 537-540.

Blanchetiére, A. y Romieu, M. 1931. La reaction histochemique de Romieu pour les substances protéiques, ses conditions d'obtention, son mechanisme et sa signification. Compt. Rend. Soc. Biol. 107: 1127-1129.

Gordon, S. A. 1956. The biogenesis of natural auxines. The Chem. and mod. of Act. of Plant. growth subst. Wain and Wightman. 65.

Kulescha, Z. 1949. Relation entre le pouvoir de proliferation spontanée des tissus de Topinambour et leur teneur en substance de croissance, Compt. Rend. Soc. Biol. (París) 143: 354-355.

Kulescha, Z. y Gautheret, R. 1948. Sur l'elaboration des substances de croissance par trois types de cultures de Scorsonère: cultures normales, cultures de Crown-Gall et cultures accoutumées à l'hétéro-auxine. Compt. Rend. Acad. Sci. (París) 227: 292-294.

Link, G. K. K. y col. 1937. Responses of beau tomato to *Phytomonas tumefaciens*.

P. tumefaciens extracts, betaindoleacetic acid and wounding. Bot Gaz. 98: 816-867.

Romieu, M. 1925. Sur la détection histochimique des substances protéiques. Bull. histol. appl. physiol. et path. et tech. microscop. 2: 185-191.

Serra, J. A. y Queiroz López, A. 1944. Direkter Nachweis von basischen Proteinen im Fellkern Naturwissenschaften, 32: 47.

Masson y Cia. Techniques de laboratoire. 652.

Thimann, K. V. 1935. On the plant growth hormone produce by *Rhizopus suinus*. J. Biol. Chem. 109, 279.

Thimann, K. V. 1956. L'origine et les fonctions des auxines, 24.

Yamaki, T. y Nakamura, K. 1952. Formation of indoleacetic acid in maize embryo. Scien. Pap. Coll. Gen. Education. Univ. Tokyo. 2: 81-98.

C. S. I. C.
INSTITUTO «JAIME FERRAN», DE MICROBIOLOGIA

COMPORTAMIENTO FRENTE A LOS ANTIBIOTICOS DE ASOCIACIONES BACTERIANAS PROCEDENTES DE INFECCIONES DEL APARATO URINARIO *

POR
ANTONIO PORTOLÉS

Al tener ocasión de comprobar las variaciones —en cuanto a grado de sensibilidad se refiere— que con carácter imprevisible se producen en la determinación de antibiogramas de gérmenes procedentes de infecciones del tracto urinario, cuya etiología es debida a asociaciones bacterianas, generalmente de tipo binario, surgió la necesidad de este grupo de experiencias en un intento de controlar o esclarecer el porqué de estas variaciones o al menos llegar a la demostración clara de su existencia, a fin de tenerlas en cuenta en la interpretación de los resultados. Al mismo tiempo, es estudiado el comportamiento de estas asociaciones bacterianas frente a mezclas bivalentes de antibióticos, ya que según hemos observado en las nefropatias de origen infeccioso en las que interviene más de un germen, es muy fácil la aparición de antibiótico-resistencia, que solamente puede vencerse con la aplicación pronta y eficaz de asociaciones sinérgicas de estos inhibidores del crecimiento bacteriano; para la determinación de esta oportuna asociación de antibióticos se precisa la investigación de antibiogramas, en los cuales pudimos comprobar comportamientos irregulares por parte de las bacterias, según estén englobadas en el producto patológico o procedan de subcultivos del aislamiento.

Las experiencias que se desarrollarán más adelante pueden clasificarse en dos grupos, que, a su vez, se dividirán en distintos apartados:

(*) Trabajo presentado al VII Congreso Internacional de Microbiología, de Estocolmo.

Para los antibióticos aislados:

a) Comportamiento de las cepas aisladas.
b) Comportamiento de asociaciones de cepas por siembra directa del producto patológico.
c) Comportamiento de asociaciones experimentales.

Asociación de antibióticos:

a) Frente al producto patológico.
b) Frente a las asociaciones binarias experimentales.

En principio, tuvimos ocasión de realizar un trabajo (Socias y Portolés, 1957) referente a identificación, frecuencia y antibiograma de bacterias Gram-positivas aisladas de procesos infecciosos del aparato urinario, en tanto que el presente trabajo se ha limitado a infecciones por asociaciones bacterianas de tipo binario, cuyo comportamiento frente a sustancias inhibidoras del crecimiento microbiano se ha intentado precisar, primero en presencia de Penicilina, Dihidroestreptomicina, Cloromicetina, Tetraciclina, Aureomicina, Terramicina, Eritromicina y Polimixina B, y más tarde, frente a diferentes asociaciones bivalentes logradas con antibióticos del más frecuente uso (Penicilina, Estreptomicina, Cloromicetina, Aureomicina, Terramicina y Tetraciclina), sirviéndonos de una técnica sobre silueta múltiple (Socias y Portolés, 1957a), con la que hemos obtenido excelentes resultados.

Los *antecedentes bibliográficos* a este respecto, son los ya indicados en el trabajo precedente, más algunas otras citas de la literatura científica referentes al comportamiento de asociaciones de antibióticos: así, mientras Sureau y Martín (1955) precisan el interés de las asociaciones de antibióticos para reforzar la actividad de cada uno de ellos oponiéndose contra una flora múltiple, Sedallan y cols. (1955) demuestran la complejidad de los factores que intervienen en las asociaciones de antibióticos. Por otra parte, Somer y Stadtbaeder (1955) afirman que las asociaciones de antibióticos permiten reducir el porcentaje de resistencias a la vez que exaltan el poder bactericida; Lenti y cols. (1955), estudiando la acción bacteriostática de diversas asociaciones de antibióticos, comprueban que existe posibilidad de antagonismo y de aquí la utilidad de las pruebas de

sensibilidad *in vitro;* por último, otros autores se ocupan también del sinergismo y antagonismo de antibióticos (Gunnison y cols., 1955) o de si el efecto sinérgico de la penicilina y estreptomicina es reversible.

Las *técnicas* empleadas para la determinación de estos antibiogramas han sido: discos de papel impregnado y nuestra técnica de impreg-

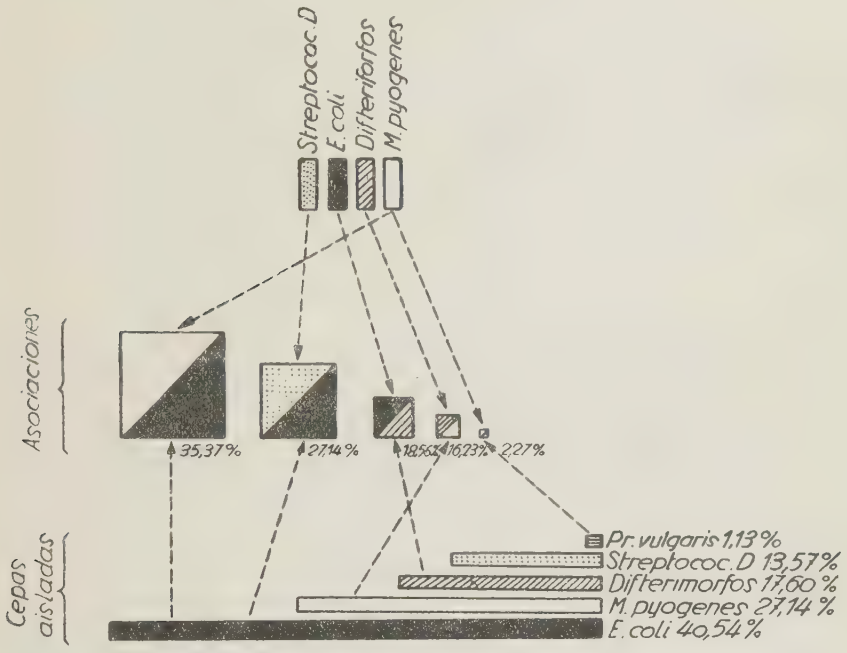


Gráfico A

nación sobre silueta múltiple para comprobar el comportamiento de las asociaciones bacterianas a las mezclas binarias de antibióticos.

El *material y medios de cultivo* fueron los que ordinariamente usamos para esta clase de trabajos, con los dos tipos de medios (base y de siembra), cuya descripción se hace en el trabajo correspondiente (Socias y Portolés, 1957a), y con los que obtuvimos excelentes resultados.

Las *muestras* estaban integradas por sedimentos de orina procedentes de enfermos en los que se conocía un proceso infeccioso del aparato urinario producido por asociación de dos gérmenes; estas muestras pueden dividirse en dos grupos: uno de 571, que sirve para interpretar

y esclarecer nuestras observaciones previas, y otro de 247, sobre el que se pone en práctica la técnica para determinación de antibiogramas mediante silueta múltiple.

Las *bacterias,* aisladas de estas asociaciones, eran: estafilococos, en-

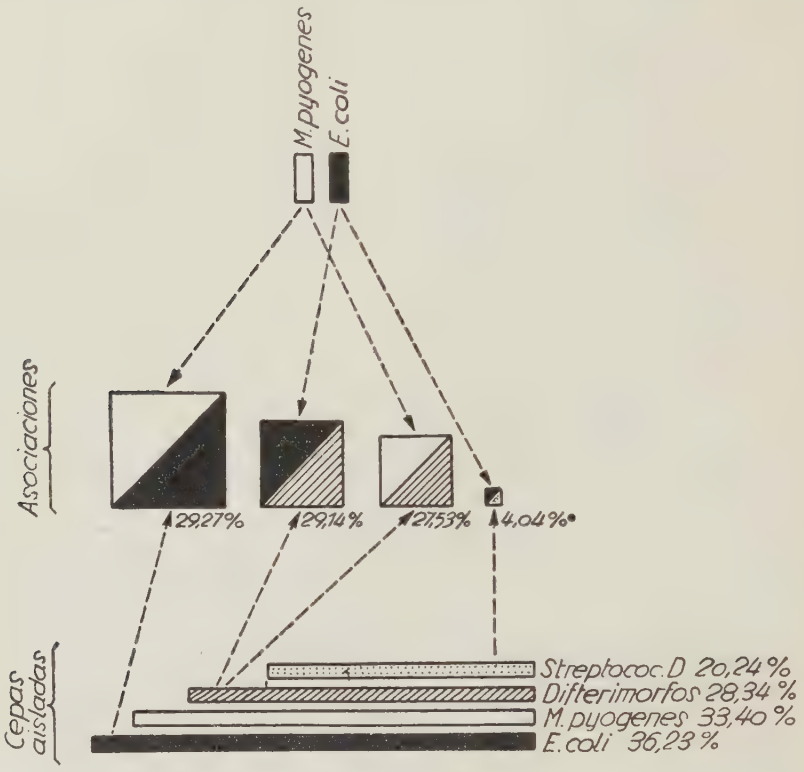


Gráfico B

terococos, colibacilos, proteus y difterimorfos; los que se han aislado en el primer grupo permiten establecer las asociaciones según el gráfico A, en tanto que el segundo grupo lo hace según el B.

En ellos se puede ver que las oscilaciones son sensiblemente paralelas, aunque con diferencias menos acusadas en el caso B y exceptuando las infecciones por coli-enterococos, que han disminuído en este grupo de experiencias.

De estos gérmenes citados podemos dar algunas particularidades: Los *E. coli,* detectados sobre los medios E. M. B. y Verde brillante, presentaron siempre carácter invasor y eran los dominantes en las asociaciones. Las infecciones estafilocócicas estaban producidas por *Micrococcus pyogenes* de las var. *aureus* y *albus,* casi todos hemolíticos recién aislados, a veces Gram-negativos o Gram-positivos muy débil en las dos primeras resiembras y casi en su totalidad penicilinasa-positivos. El grupo de enterococos estaba integrado por *Strep. faecalis,* algún *Strep. liquefaciens* y otros estreptococos del grupo D, no determinados, pero todos ennegrecían los medios con esculina. Los difterimorfos eran *Corynebacterium nefridii* (Buesin G. y Freytag, 1954) y otras corinebacterias no identificadas exactamente. En algunos casos también se encontraron especies de *Proteus vulgaris,* siempre asociados a estafilococos.

CUADRO I

Grupos	Asociaciones identificadas	Núm. casos	%
A	*E. coli* — *M. pyogenes.*	202	35,37
	E. coli *Strep.* grupo D.	155	27,14
	E. coli — Corinebacterias.	106	18,56
	M. pyogenes — Corinebacterias.	95	16,63
	M. pyogenes — *Proteus vulgaris*	13	2,27
B	*M. pyogenes* — *E. coli*	97	39,27
	E. coli — Corinebacterias.	72	29,14
	M. pyogenes — Corinebacterias.	68	27,53
	E. coli — *Strep.* grupo D.	10	4,04

RESULTADOS

a) *Antibiogramas sobre el producto patológico.*

En esta parte se examina el comportamiento de las asociaciones bacterianas tal y como se encuentran en la orina, ya que, recién recogidas estas muestras patológicas, eran centrifugadas para practicar la determinación directamente sobre el sedimento.

1.—Asociación coli-estafilococos: es la más frecuente (35, 37 %) y en ella siempre tiene carácter invasor el colibacilo; son 202 casos.

	Pen.	Estr.	Clor.	Aur.	Terr.	Tetr.	Erit.	Polim.	Bacit.
Sensibles... ...	0	2	174	10	12	9	4	3	2
Sens. limit. ...	16	31	11	21	26	30	10	7	5
Resistentes ...	186	169	17	161	164	163	188	192	195

2.—Asociación coli-estreptococos del Grupo D, 155 casos, 27,14 %.

Sensibles... ...	0	0	130	7	9	6	1	0	4
Sens. limit. ...	13	23	16	57	61	56	5	3	10
Resistentes ...	142	132	9	91	85	93	149	152	141

3.—Asociación coli-corinebacterias, 16 casos, 18,56 %.

Sensibles... ...	0	52	89	39	45	38	0	1	1
Sens. limit. ...	2	44	12	26	23	28	4	7	103
Resistentes ...	104	10	5	41	38	40	102	98	2

4.—Asociación estafilo-corinebacterias, 95 casos, 16,63 %.

Sensibles... ...	28	0	31	20	18	19	72	2	32
Sens. limit. ...	28	3	7	7	10	6	18	15	14
Resistentes ...	39	92	57	68	67	70	5	78	49

5.—Asociación estafilo-*proteus*, 13 casos, 2,27 %.

Sensibles... ...	0	3	8	6	7	4	0	0	0
Sens. limit. ...	1	2	2	2	1	3	0	1	1
Resistentes ...	12	8	3	5	5	6	13	12	12

En algunos casos de los aquí examinados tuvimos ocasión de comprobar la variación hacia la resistencia a medida que se iban administrando los antibióticos.

b) *Antibiogramas de los gérmenes aislados.*

1.—Estableciendo un orden de frecuencia, se encuentra: *E. coli,* en 463 casos asociado a estafilococos (35,37 %), estreptococos D (27,14 %) corinebacterias (18,56 %); sus comportamientos se deducen de las cifras que siguen a continuación:

	Pen.	Estr.	Clor.	Aur.	Terr.	Tetr.	Erit.	Polim.
Sensibles... ...	0	180	213	110	112	109	0	190
Sens. limit. ...	5	220	189	165	168	167	16	260
Resistentes ...	458	63	61	188	183	187	447	13

2.—*Micrococus pyogenes,* var. *aureus* y *albus,* en 310 casos; asociado a colibacilo (35,37 %), a corinebacterias (16,63 %) y a *proteus* (2,27 %).

Sensibles... ...	62	0	156	66	68	62	77	0
Sens. limit. ...	86	10	116	132	124	137	83	13
Resistentes ...	162	300	28	102	108	101	150	297

3.—*Corynebacterium nefridii* y otros difterimorfos en 201 casos, asociados al colibacilo (18,56 %) y al estafilococo (16,63 %).

Sensibles... ...	4	7	49	40	43	42	50	1
Sens. limit. ...	155	163	122	125	120	121	119	11
Resistentes ...	42	31	30	36	38	38	32	189

4.—*Streptococcus faecalis* y otros del grupo D, en 155 casos; asociados al colibacilo (27,14 %).

Sensibles... ...	5	53	98	91	97	91	102	0
Sens. limit. ...	23	53	26	30	30	29	11	13
Resistentes ...	127	49	31	34	28	35	32	142

5.—*Proteus vulgaris* en 13 casos, asociados a estafilococos (2,27 %)

Sensibles... ...	0	7	12	0	1	0	0	0
Sens. limit. ...	0	3	0	4	3	3	1	2
Resistentes ...	13	3	1	9	9	10	12	11

Con ello hubo ocasión de observar esas variaciones que calificábamos de "imprevisibles", ya que para cada muestra de orina, los antibiogramas determinados en las especies aisladas no eran, muchas veces, lo que cabía esperar por el comportamiento de la asociación, y esta fué la causa de que se estudiaran los

c) *Antibiogramas de asociaciones bacterianas experimentales.*

En efecto, al ver las múltiples variaciones de los resultados obtenidos, por una parte para orinas con infecciones análogas en etiología, y por otra para las especies aisladas de aquellas asociaciones —pese a tratarse de gérmenes de una misma especie— se determinaron los antibiogramas de asociaciones binarias establecidas experimentalmente a partir de grupos de dos gérmenes, cuyo comportamiento frente a los antibióticos era conocido previamente. Se prepararon inóculos correspondientes a los cinco tipos de asociaciones encontrados en los productos patológicos variando las proporciones de cada germen, de forma que se obtuvieran tres inóculos distintos a partir de cinco diferentes especies bacterianas de conocido comportamiento frente a los antibióticos, según se deduce en el cuadro a continuación:

CUADRO II

ANTIBIOTICOS	Comportamiento de las cepas en ensayo									
	Colibacilos		Estafilococos		Estrep. D.		Corunebact.		Proteus	
Penicilina...	R	R	SL	R	R	R	R	R	R	R
Estreptomicina	SL	SL	R	R	R	R	R	R	S	SL
Cloromicetina.	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Aureomicina...	SL	S	SL	SL	R	R	SL	R	R	R
Terramicina...	S	S	SL	SL	SL	R	SL	SL	R	SL
Tetraciclina...	SL	SL	SL	SL	R	R	SL	SL	R	SL
Eritromicina..	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R
Polimixina B.	R	R	R	SL	R	R	R	SL	R	R
Bacitracina	R	R	R	R	R	R	S	MS	R	R

CUADRO III

ASOCIACIONES	Proporciones de las mezclas inóculos		
	I	II	III
E. coli - *M. pyogenes.*	1/3	2/2	3/1
E. coli - *Strep.* Grupo D.	1/3	2/2	3/1
E. coli - Corinebacterias.	1/3	2/2	3/1
M. pyogenes - Corinebacterias..	1/3	2/2	3/1
M. pyogenes - *Proteus vulgaris*	1/3	2/2	3/1

Los resultados obtenidos no fueron nada alentadores, ya que no existió relación entre los halos e inhibiciones de las diferentes asociaciones bacterianas y las que cabía esperar por el espectro antibiótico de las cepas aisladas, o, por el contrario, la unión de dos cepas sensibles puede provocar la aparición de asociaciones antibiótico-resistentes. Ello es la causa de que propongamos definitivamente, como práctica de rutina en la Clínica, la determinación de antibiogramas de infecciones bivalentes frente a asociaciones de antibióticos, y así lo realizamos:

d) *Antibiogramas con asociación de antibióticos.*

Se utilizó la técnica propia sobre 247 orinas, seleccionando cuatro tipos de asociaciones, obteniéndose los resultados que se indican en el cuadro correspondiente.

CUADRO IV

Antibióticos	*Estafiloc.-difterim.*			*Coli-difterim.*			*Coli-estafiloc.*			*Coli-estrep. D*		
	S	SL	R	S	SL	R	S	SL	R	S	SL	R
Penicilina	18	18	32	0	3	69	0	10	87	0	2	8
Penic.-estrep..	10	8	50	17	7	48	8	36	53	3	5	2
Penic.-clorom.	20	30	18	28	32	12	9	42	46	6	2	2
Penic.-aureom.	14	38	16	19	21	32	6	28	63	5	2	3
Penic.-terram.	15	33	20	20	23	29	7	40	50	5	4	1
Penic.-tetrac.	11	36	21	16	27	29	8	32	57	4	5	1
Estreptomicina	0	6	62	16	52	4	5	13	79	0	5	5
Estrep.-clorom.	63	3	2	58	11	3	6	21	70	3	3	4
Estrep.-aureom... ...	17	10	41	51	11	10	20	54	23	5	3	2
Estrep.-terram.	15	16	37	52	12	8	29	51	17	6	4	0
Estrep.-tetrac.	14	14	40	49	10	13	19	53	25	5	2	3
Cloromicetina	16	12	40	54	11	7	69	17	11	7	2	1
Clorom.-aureom... ...	29	17	22	48	9	15	71	14	12	5	3	2
Clorom.-terram... ...	31	18	19	69	3	0	83	12	2	5	4	1
Clorom.-tetrac.	26	17	25	49	13	10	90	7	0	7	2	1
Aureomicina.	12	5	51	25	19	28	5	11	81	4	3	3
Aureom.-terram.. ...	10	10	48	21	10	41	2	6	89	4	2	4
Aureom.-tetrac.	11	8	49	24	12	36	3	12	82	4	3	3
Terramicina.	11	7	50	28	18	26	7	10	80	5	2	3
Terram.-tetrac.	11	4	43	12	20	40	11	17	69	6	2	2
Tetraciclina...	9	6	53	27	16	29	7	12	78	3	3	4

Resultados éstos con los que se pueden establecer los gráficos de resistencia que expresen la vulnerabilidad de las infecciones mixtas a las diferentes combinaciones binarias de antibióticos, a la vez que frente a los antibióticos aislados.

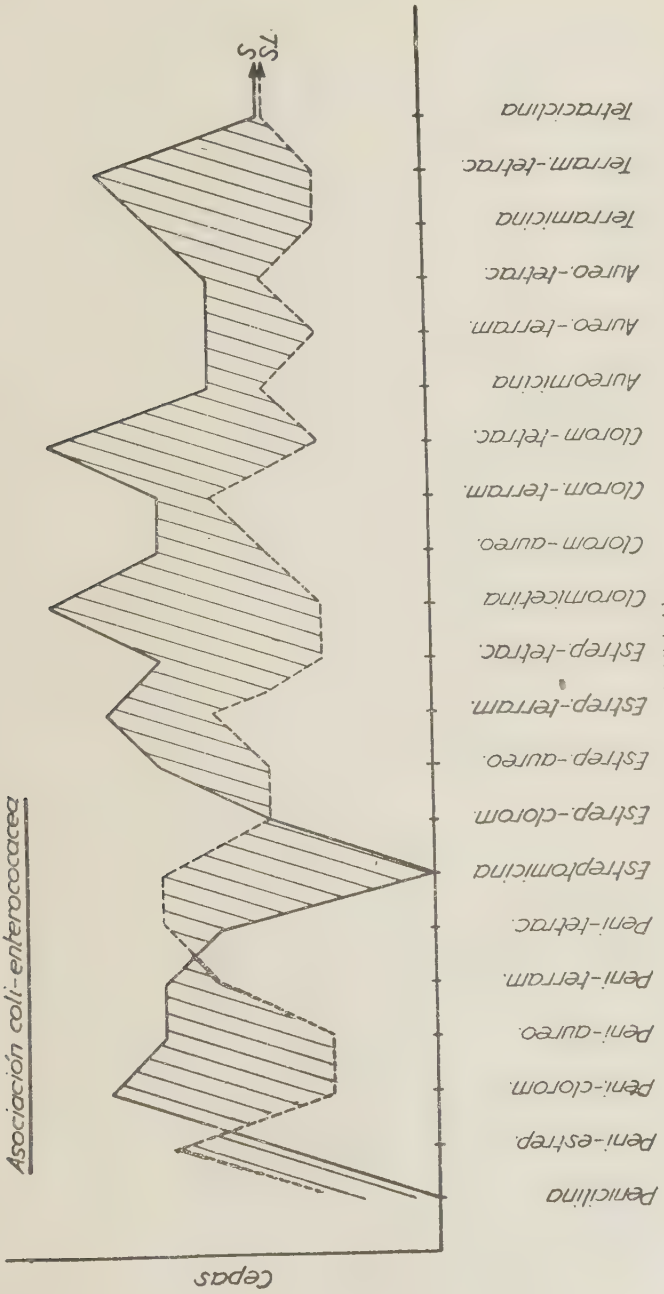

Asociación coli-enterococcaea
TSS
Cepas
Penicilina
Peni.-estrep.
Peni.-clorom.
Peni.-aureo.
Peni.-terram.
Peni.-tetrac.
Estreptomicina
Estrep.-clorom.
Estrep.-aureo.
Estrep.-terram.
Estrep.-tetrac.
Cloromicetina
Clorom.-aureo.
Clorom.-terram.
Clorom.-tetrac.
Aureomicina
Aureo.-terram.
Aureo.-tetrac.
Terramicina
Terram.-tetrac.
Tetraciclina
Antibióticos

Gráfico C

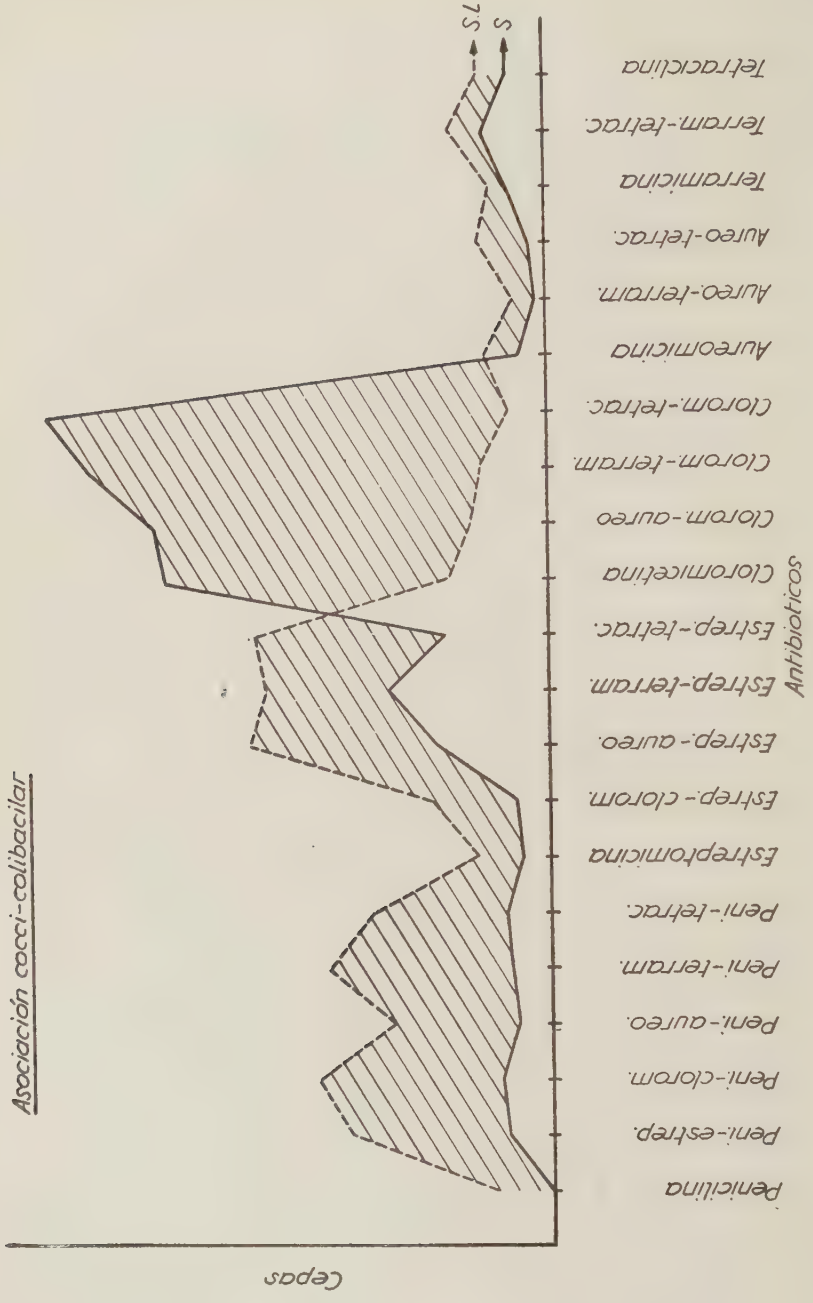

Asociación cocci-colibacilar
Cepas
Penicilina
Peni-estrep.
Peni-clorom.
Peni-aureo.
Peni-terram.
Peni-tetrac.
Estreptomicina
Estrep.-clorom.
Estrep.-aureo.
Estrep.-terram.
Estrep.-tetrac.
Cloromicetina
Clorom.-aureo
Clorom.-terram.
Clorom.-tetrac.
Aureomicina
Aureo-terram.
Aureo-tetrac.
Terramicina
Terram.-tetrac.
Tetraciclina
Antibióticos
S
TS

GRÁFICO D

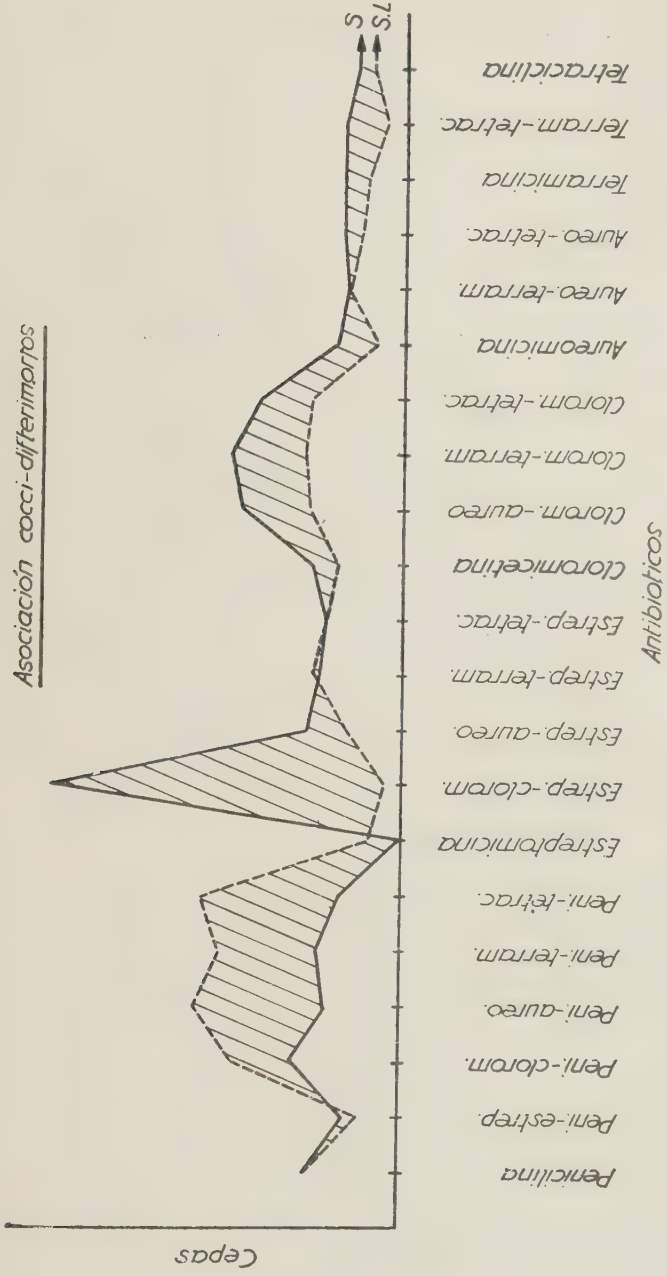

Asociación cocci-diftenimortos
Cepas
T.S
S
Penicilina
Peni.-estrep.
Peni.-cloram.
Peni.-aureo.
Peni.-terram.
Peni.-tetrac.
Estreptomicina
Estrep.-cloram.
Estrep.-aureo.
Estrep.-terram.
Estrep.-tetrac.
Cloromicetina
Cloram.-aureo
Cloram.-terram.
Cloram.-tetrac.
Aureomicina
Aureo.-terram.
Aureo.-tetrac.
Terramicina
Terram.-tetrac.
Tetraciclina
Antibióticos

GRÁFICO E

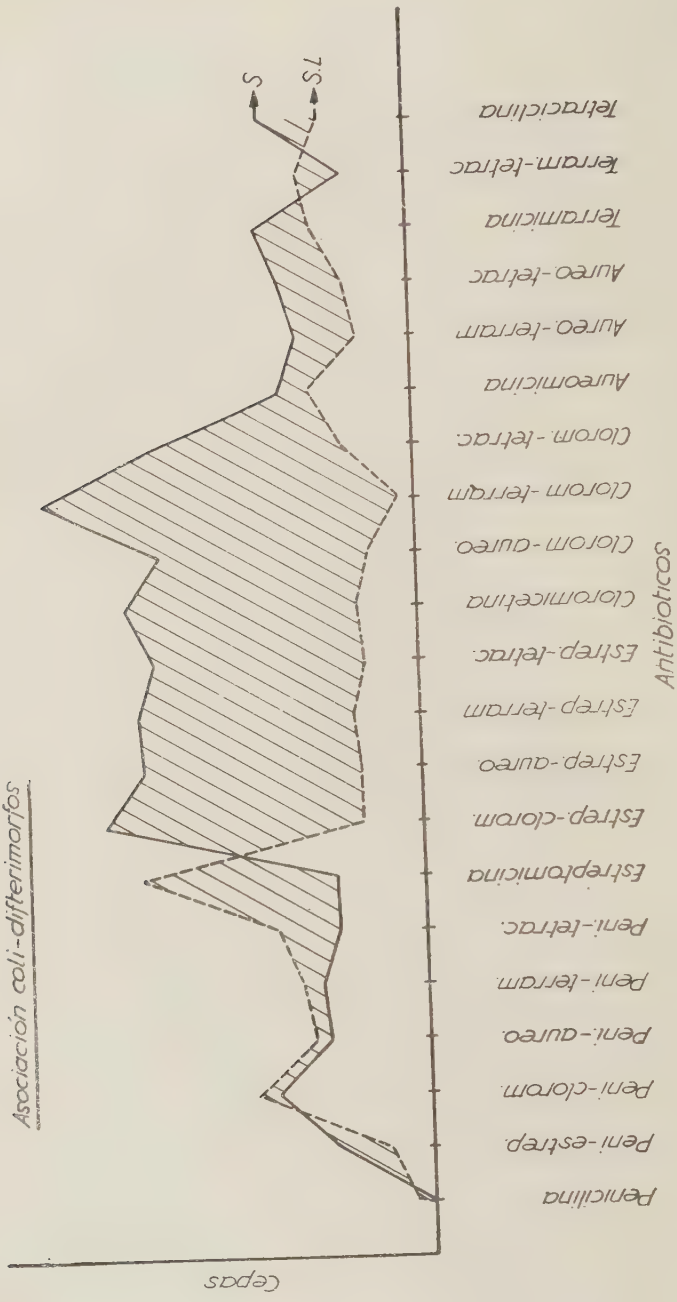

Asociación coli-diferimorfos
Cepas
Antibióticos
Penicilina
Peni.-estrep.
Peni.-cloram.
Peni.-aureo.
Peni.-terram.
Peni.-tetrac.
Estreptomicina
Estrep.-cloram.
Estrep.-aureo
Estrep.-terram
Estrep.-tetrac.
Cloromicetina
Cloram.-aureo.
Cloram.-terram
Cloram.-tetrac.
Aureomicina
Aureo.-terram
Aureo.-tetrac
Terramicina
Terram.-tetrac
Tetraciclina
S
T.S

Gráfico F

Las "zonas de vulnerabilidad" (rayadas en el dibujo), pueden tener un sentido positivo o negativo, según que la línea S sea superior o inferior a la S. L.

e) *Mezclas de antibióticos frente a asociaciones bacterianas experimentales.*

Al igual que en el apartado *c)*, preparamos a modo de orientación tres mezclas variables de gérmenes tipo cocci y colibacilo; los resultados fueron contradictorios, imprevisibles, y tan poco homologables como era de esperar por los ensayos efectuados precedentemente.

Al hacer las oportunas *consideraciones sobre los resultados*, y con la premisa de que actuando sobre la flora bacteriana tal como se encuentra en el producto patológico, es el único medio de obtener comportamientos que se asemejen con toda posibilidad a lo que sucederá más tarde *in vivo*, nos encontramos que:

a) Las asociaciones bacterianas con sensibilidad limitada o resistentes a varios antibióticos, son capaces de desarrollar rápidamente la resistencia frente a un nuevo antibiótico para el que eran sensibles.

b) Para el grupo de las tetraciclinas, los halos de inhibición que se obtienen en las asociaciones bacterianas, son mayores que para cada especie aisladamente considerada; ello puede ser debido a que los productos de lisis masivas de las bacterias más sensibles ayudan a inhibir el desarrollo de las más resistentes, y lo mismo sucede con la cloromicetina.

c) La estreptomicina (activa frente a los coliformes) y la bacitracina (eficaz contra los difterimorfos) ven por el contrario disminuída su acción al actuar frente a esta asociación.

d) La eritromicina (excepción hecha de las asociaciones cocci-difterimorfas) y polimixina B son muy poco activas y la penicilina absolutamente nada.

e) Cuando de la asociación de dos cepas con sensibilidad limitada a un determinado antibiótico se obtienen halos de inhibición mayores, puede ser por una manifiesta disminución de la antibiótico-resistencia, debido posiblemente a que productos del metabolismo alterado de una especie lisada pueden intervenir en perjuicio de la otra. Por otra parte, también es posible que de la acción simultánea de fermentos de dos especies sensibles se originen colonias o cepas resistentes.

f) En la determinación de antibiogramas con asociaciones binarias de antibióticos sobre otro grupo de muestras, observamos que las asociaciones de tetraciclina y derivados de constitución análoga (aureomicina-tetraciclina y terramicina tetraciclina o aureomicina-terramicina), algunas veces (asociación cocci-colibacilar) producen halos inferiores a los antibióticos aisladamente considerados, sin que ello nos permita calificarlos propiamente de antágonicos, y otras veces un ligero aumento de tipo aditivo, posiblemente porque, al funcionar ambos de modo análogo, los resultados son los que corresponderían a un aumento de dosis de cualquiera de los dos aisladamente considerados. Asimismo, en muchos de estos casos, la mezcla estreptomicina-cloromicetina no manifiesta apenas aumento de actividad.

g) Hay marcado sinergismo entre cloromicetina y terramicina, y estreptomicina y cloromicetina para las asociaciones *coli-difterimorfas;* y cloromicetina y estreptomicina para las de *estafilo-difterimorfas;* y *cloromicetina-tetraciclina* y derivados tetraciclínicos para las *cocci-colibacilares.* Por esto puede considerarse a la cloromicetina como el más destacado agente potencializante de estreptomicina, terramicina y tetraciclina; ello puede ser debido al uso tan selectivo que de esta sustancia se hace, empleándola de preferencia tan sólo en los casos de salmonelosis y brucelosis principalmente. El resto de las asociaciones presenta un comportamiento menos definido.

h) Las "zonas de vulnerabilidad" más amplias y con sentido positivo señalan a la cloromicetina como la substancia idónea para obtener sinergismos en las inhibiciones de crecimientos bacterianos.

i) Parece ser que cuando intervienen asociaciones de antibióticos, la resistencia a ellos debe desarrollarse más lentamente y, por tanto, la infección obedece mejor al tratamiento; son necesarias además poblaciones bacterianas muy grandes para que haya gérmenes que resistan simultáneamente a los dos antibióticos. En cuanto a las infecciones, es posible que haya un refuerzo del poder patógeno por acción simultánea de varias especies.

RESUMEN

En este trabajo se estudia el comportamiento de asociaciones bivalentes de gérmenes, aislados de procesos infecciosos del aparato urinario, frente a penicilina, estreptomicina, cloromicetina, polimixina B, eritromicina, aureomicina, terramicina y tetraciclina, así como las variaciones de sensibilidad entre las diferentes cepas aisladas o asociadas. También se establecen asociaciones de tipo experimental con algunas de las cepas aisladas, y se observan las variaciones que se obtienen en los antibiogramas, en relación con las modificaciones introducidas en los porcentajes de estas asociaciones binarias.

Por los resultados obtenidos se demuestra la *necesidad de determinar estos antibiogramas, directamente sobre el producto patológico, sin aislamiento previo de las especies bacterianas, y precisamente por técnicas en las que se observe simultáneamente el comportamiento frente a antibióticos aislados y en asociación.* Una vez más se comprueba sobre 247 orinas de enfermos, la eficacia de un nuevo método para determinación de antibiograma mediante silueta múltiple de papel impregnado, frente a las quince distintas asociaciones binarias de antibióticos logradas con penicilina, estreptomicina, cloromicetina, aureomicina, terramicina y tetraciclina, conociendo rápidamente el comportamiento sinérgico, antagónico o indiferente de las sustancias antibióticas asociadas.

Los resultados pueden resumirse diciendo que: *a),* la penicilina es prácticamente inactiva frente a los distintos tipos de asociaciones estudiadas; *b),* la eritromicina es la más activa frente a infecciones *cocci-difteroides,* mientras que la cloromicetina lo es para las *cocci-colibacilares* y *coli-difterimorfas; c),* con el grupo de las tetraciclinas no observamos alentadores resultados para las asociaciones ensayadas por tratarse quizá de cepas infectantes de enfermos que habían sido tratados ampliamente con este tipo de antibióticos, y *d), las mezclas de antibióticos más eficaces han sido: cloromicetina-tetraciclina para las asociaciones cocci-colibacilares, la estreptomicina-cloromicetina para los cocci-difteroides y la cloromicetina-terramicina para los coli-difterimorfos.*

SUMMARY

In this work is studied the conduct of bivalent associations of germes, isolated in pathological process from the urinary tract in presence of Penicillin, Dihydrostreptomycin, Chloromycetin, Aureomycin, Terramycin, Tetracyclin, Polimyxin B and Erythromycin, as well as the sensivity variations among the differents strains separated or associated. There are also experimental type associations established with some of the strains isolated, and the variations obtained are observed in the antibiograms in relation to the modifications introduced on the percentage of this binarys associations.

The resultats obtained show the need for determination of these antibiograms directly on the pathological products and without previous isolation of the bacterial species.

Once more, evidence is given on 247 urines of the patiens of the efficience of a new method for determination of multiple-silhouttes of impregnated paper in presence of the fifteen diferent binarys association of antibiotics received with Penicillin. Dhydrostreptomycin, Chloromycetin, Aureomycin, Terramycin and Tetracyclin, in order to know rapidly the behaviour of the antibiotics substances: whether it is synergyst, antagonistic or indiferent.

The results can be summarised as follow: Penicillin is inactive in presence of the four types of associeted germes studied. Erythromycin is the most active in presence of the cocci-dyphteroids, while Chloromycetin is active in presence of the cocci-coliforms. The most eficient antibiotics mixtures are Chloromycetin-Tetracyclin for cocci-coliforms associations Streptomycin-Chloromycetin for cocci-dyphteriforms associations and Chloromycetin-terramycin for coli-difteriforms associations.

BIBLIOGRAFIA

Buesing y Freytag. 1954. Zentr. Bakt. Abt. I, 160 (7/8) 577.
Gunninson, Kunidhige y Jawetz. 1955. J. gen. Microbiol. 13, 509.
Lenti, Odone, Fazio y Calciati. 1955. G. Batt. Immun. 48, 224.
Sedallan, Bertoye, Carraz, Courtieu y Gauthier. 1955. Rev. Lyon. Med. 4, 657.
Socias y Portolés. 1957. Microbiología Española, 10 (1), 5.
Socias y Portolés. 1957a. Microbiología Española.
Somer y Stadtbaeder. 1955. Presse Med. 63, 1875.
Sureau y Martín. 1955. Vie (Méd. París), 36, 876.

EL CONGRESO DE ESTOCOLMO

Del 4 al 9 del pasado mes de agosto, según estaba proyectado, se celebró, bajo el alto patrocinio de S. M. el Rey de Suecia, el VII Congreso Internacional de Microbiología en Estocolmo, con más de mil quinientos congresistas, pertenecientes a cuarenta y cinco países.

El Presidente del Congreso y del Comité Ejecutivo era el Prof. Sven Gard; Secretario general y del Comité Ejecutivo, el Dr. Carl-Göran Hedén. Por la parte española, el Prof. Vilas formaba parte del Comité de Honor; los Dres. Sols y Vicente llevaron la representación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

El Congreso comprendió seis Secciones y otros tantos simposios: Sección A, Fisiología y Genética Microbianas, con 89 comunicaciones; Sección B, Química Microbiana, 86; Sección C, Inmunología, 92; Sección D, Virología, 81; Sección E, Bacteriología Humana y Veterinaria, 89; Sección F, Microbiología Industrial, 59. Los simposios y directores de los mismos fueron los siguientes:

I. "Mecanismos de recombinación en las bacterias", Prof. J. Lederberg.

II. "Papel de las proteínas en la síntesis del ácido nucleico y papel del ácido nucleico en la síntesis proteínica", Prof. A. Tiselius.

III. "Anticuerpos tisulares específicos", Prof. E. Witebsky.

IV. "Infecciones por virus latentes y enmascarados", Dr. Ch. Andrewes.

V. "Animales libres de gérmenes", Dir. F. S. Daft.

VI. "Métodos de cultivo continuos y su aplicación", Dr. D. W. Henderson.

Las comunicaciones españolas fueron:

a) Leídas y objeto de discusión:

Influencia de algunos factores nutritivos sobre el metabolismo del *Streptomyces griseus,* Prof. *B. Regueiro* y Dr. *R. Otero (F).*

Modificaciones en la pared celular de las bacterias durante el ciclo "L", Dr. *M. Rubio* (A).

Efecto hemolítico de un glucolípido producido por *Ps. aeruginosa,* Dr. *G. Sierra* (B).

Mecanismos de transporte activo de azúcares en levaduras, Dres. *A. Sols* y *G. de la Fuente* (A).

Equilibrio huésped-parásito en el fenómeno de citoarjesis, Dr. *R. Vicente-Jordana* (A).

b) Presentadas:

Relaciones entre la concentración de triptofano en los tallos de olivo y la localización de los tumores, Dra. *R. Beltrá* (B).

Enriquecimiento y purificación del estafilococo toxígeno en los medios clorurados, Prof. *V. Callao* (E).

Producción de acetaldehido por el *Clostridium acetobutylicum,* Prof. *V. Callao* y Dr. *E. Montoya* (F).

Un nuevo antibiótico (la debariocidina) producido por el *Bacillus subtilis,* Dres. *J. Pérez-Silva* y *R. Lahoz* (F).

Efecto de los antibióticos sobre cultivos bacterianos mezclados procedentes de infecciones del trayecto urinario, Dr. *A. Portolés* (E).

Progresos en el estudio de citoarjesis, Dr. *R. Vicente-Jordana* (C).

De los autores citados, dentro del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, el Prof. Callao y el Dr. Montoya pertenecen a la Estación Experimental del Zaidín, y los Dres. Sols y de la Fuente, al Departamento de Enzimología; los restantes, al Instituto "Jaime Ferrán", de Microbiología. Y, con excepción de los Dres. De la Fuente, Otero y Sols, son todos miembros de la Sociedad de Microbiólogos.

En Uppsala, se celebró la reunión de las Delegaciones Nacionales de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología. La Delegación española la compusieron los Dres. Ronda, Sierra y Vicente; este último, como miembro fundador, llevó el voto de la Sociedad española. En la reunión, se acordó que el VIII Congreso se celebrase en Montreal (Canadá) en agosto de 1962. Asimismo, se designó la nueva Directiva de la A. I. S. M., que quedó constituída como sigue:

Presidente, Prof. S. Mudd; Vicepresidentes, Dr. A. A. Miles y Prof. G. Penso; Tesorero, Prof. M. Welsch; Secretario general, Dr. C.-G. Hedén.

El Congreso, si científicamente no ha presentado novedades espectaculares, sí ha permitido el intercambio fecundo de ideas, ayudado en todo momento por las atenciones cordiales de los organizadores y de los colegas suecos. En el orden humano, los días pasados en la capital sueca han significado para los asistentes, y en especial para los de climas más alejados, un contacto de gran interés, que ha dejado un recuerdo nada fácil de borrar.

ACTAS DE LA SOCIEDAD

Acta de la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles el día 7 de marzo de 1958.

Se abre la sesión a las veinte horas y diez minutos, en el Salón de Actos del Instituto "Ramón y Cajal", del C. S. I. C., Velázquez, 138. Preside D. Gerardo Clavero del Campo y actúa como Secretario D. Lorenzo Vilas.

Se aprueba el Acta de la sesión anterior. Se admiten como Socios de número a D. Enrique Montoya Gómez, Farmacéutico, de Granada, presentado por D. Vicente Callao y D. Lorenzo Vilas; a D. Rafael Lahoz Oliver, Químico, de Madrid, presentado por D. Lorenzo Vilas y D. Miguel Rubio, y a D. Gonzalo Sierra Rico, Químico, de Madrid, presentado por la Srta. María del Carmen Cándida González y don Julio Pérez Silva.

El señor Rubio Huertos da lectura a un trabajo suyo, en colaboración con el señor Templado, titulado: "Un virus poliédrico en larvas de *Stilpnotia salicis*. A continuación, el señor Portolés expone unas "Observaciones acerca de la acción pleomorfizante de los antibióticos", y se entabla una animada discusión en la que intervienen los señores Rubio, Vicente y el Secretario.

Se levanta la sesión a las veinte horas y cuarenta y cinco minutos.

Acta de la sesión celebrada en Madrid por la Sociedad de Microbiólogos Españoles el día 27 de junio de 1958.

Se abre la sesión a las veinte horas y diez minutos, en el Salón de Actos del Instituto "Ramón y Cajal", del C. S. I. C., Velázquez, 138. Preside D. Gerardo Clavero del Campo y actúa como Secretario D. Lorenzo Vilas.

Se aprueba el Acta de la sesión anterior. El señor Presidente indica que va a procederse al escrutinio de los votos secretos recibidos para

la renovación parcial reglamentaria de la Junta Directiva. Esta renovación comprende los cargos de Presidente, Tesorero, Bibliotecario y cuatro Vocales.

Se designa a las señoritas Alonso y Tejerina para que colaboren en el escrutinio. Efectuado éste, se obtienen los siguientes resultados: Votos recibidos, 77. Presidente: D. Gerardo Clavero del Campo, 73 votos; D. Miguel Benlloch Martínez, 3; D. Lorenzo Vilas López, 1. Tesorero: D. Miguel Benlloch Martínez, 72 votos; D. Eduardo Gallardo Martínez, 3; D. Juan Santa María Ledochowski, 1. Bibliotecario: don Ricardo Salaya León, 77. Vocales: D. Eduardo Gallardo Martínez, 73; don José García Bengoa, 75; D. Juan Manuel Martínez-Arroyo Núñez, 74; D. Miguel Rubio Huertos, 76; D. Angel García Gancedo, 1; doña Genoveva Tejerina Domínguez, 2; D. Román Vicente Jordana, 1; don Julio Pérez Silva, 1; D. Rafael Préstamo Huerta, 1; D. Rodrigo Moreno Sanmartín, 1.

A la vista de los resultados anteriores, quedan elegidos: Presidente: don Gerardo Clavero del Campo. Tesorero: D. Miguel Benlloch Martínez. Bibliotecario: D. Ricardo Salaya León. Vocales: D. Eduardo Gallardo Martínez, D. José García Bengoa, D. Juan Manuel Martínez-Arroyo Núñez y D. Miguel Rubio Huertos.

D. Gerardo Clavero del Campo, en su nombre y en el de los demás directivos designados, agradece la confianza manifestada por la votación y hace un llamamiento para que todos los socios colaboren de la manera más intensa en las tareas a desarrollar. Asimismo, da cuenta de una carta de la Asociación Internacional de Sociedades de Microbiología en la que invita a la Sociedad de Microbiólogos Españoles a que nombre delegados para asistir a la Reunión que se celebrará en Estocolmo, con motivo del VII Congreso Internacional. Se acuerda que la Junta, a la vista de los Miembros asistentes a dicho Congreso, designe tres representantes.

Por último, el Secretario expone algunos aspectos de los dos Congresos anteriores al de Estocolmo.

Se levanta la sesión a las veintiuna horas y cinco minutos.

Depósito legal, M. 702. 1958

Artes Gráficas REYES. - Jerónima Llorente, 15. - MADRID

OTRAS REVISTAS DEL PATRONATO «ALONSO DE HERRERA»

ANALES DE EDAFOLOGIA Y FISIOLOGIA VEGETAL.—Publicados por el Instituto de Edafología y Fisiología Vegetal.

Continuadores de los "Anales del Instituto Español de Edafología, Ecología y Fisiología Vegetal". Abiertos a una amplia colaboración, recogen en sus páginas trabajos sobre suelos y fisiología vegetal, tanto del Instituto de origen como de otros Centros investigadores españoles y extranjeros y, asimismo, estudios de tipo informativo y bibliográfico.

Mensual. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 160 pesetas.

ANALES DE LA ESTACION EXPERIMENTAL DE "AULA DEI".—Revista dedicada a la publicación de trabajos originales sobre investigación agrícola y problemas biológicos relacionados con la misma. Publicada por la Estación Experimental de "Aula Dei", Zaragoza.

Cada volumen, excepto Vol. I, contiene unas 300 páginas, distribuídas en cuatro números, que se publican a intervalos irregulares.

Ejemplar, 40 pesetas. Suscripción, 120 pesetas.

ANALES DEL INSTITUTO BOTANICO "A. J. CAVANILLES".—Publicación del Instituto "Antonio J. de Cavanilles".

Publica trabajos y notas científicas que abarcan todos los campos de la Botánica.

Ejemplar, 110 pesetas. Suscripción, 100 pesetas.

ARCHIVO DE ZOOTECNIA.—Recoge los trabajos de investigación del Departamento de Zootecnia de Córdoba, sobre Ganadería, Producción Animal e Industrias Pecuarias.

Trimestral. España: número suelto, 30 pesetas. Suscripción anual, 100 pesetas. Extranjero: número suelto, $ 1.5. Suscripción, $ 4.

COLLECTANEA BOTANICA.—Publicación del Instituto Botánico de Barcelona.

Dedicado a la Botánica en general, viene a ser un órgano exterior de la actividad del Instituto Botánico de Barcelona, elemento de enlace con los demás Centros de investigación.

Publica trabajos sobre las distintas disciplinas de la Botánica: Sistemática, Florística, Fitosociología, Fisiología, Micología, Briología, Algología, etc.

Dedica una parte a reseñas bibliográficas y a la información.

Semestral. Ejemplar, 45 pesetas. Suscripción, 90 pesetas.

FARMACOGNOSIA.—Publicación del Instituto "José Celestino Mutis".

Esta revista está dedicada al estudio de los problemas de la Farmacognosia, siendo sus finalidades: una, propiamente científica, que trata de Botánica, análisis químico, experimentación fisiológica y clínica, y otra, de orden práctico, relativa al cultivo y recolección de materias primas idóneas, no sólo para la Medicina, sino para la Dietética y la Industria.

Trimestral. Ejemplar, 25 pesetas. Suscripción, 80 pesetas.

GENETICA IBERICA.—Publicación del Laboratorio de Citogenética del Instituto "José Celestino Mutis".

Publica trabajos sobre Citología, Citogenética y Genética de los diversos materiales que constituyen el tema específico de investigación en los distintos Centros colaboradores de la revista, en España y Portugal, y los relacionados con la mejora de las especies vegetales que interesan a la Farmacognosia.

Trimestral. Ejemplar, 20 pesetas. Suscripción, 70 pesetas.

SE SOLICITA EL CAMBIO
ON PRIE L'ECHANGE
AUSTAUSCH ERWUNSCHT
EXCHANGE DESIRED

TODA LA CORRESPONDENCIA
DEBE DIRIGIRSE A
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA
JOAQUIN COSTA, 32 - MADRID - (ESPAÑA)

Número suelto: 30 pesetas. Suscripción anual (4 números): 110 pesetas.

CONSEJO SVPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS
MICROBIOLOGIA ESPAÑOLA